

ROYAUME DE BELGIQUE

BREVET D'INVENTION



RL

MINISTÈRE DES AFFAIRES ÉCONOMIQUES

N° 879.273

Classif. Internat.:

C07G/C07H/A67K

Mis en lecture le:

09-04-1980

Le Ministre des Affaires Économiques,

Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention;

Vu le procès-verbal dressé le 9 octobre 1979 à 14 h. 00
au Service de la Propriété industrielle;

ARRÊTE :

Article 1. — Il est délivré Σ aux Stés dites : KAKEN CHEMICAL CO. LTD.,
et TAITO CO., LTD.,

resp. : 28-8, 2-chome, Honkomagome, Bunkyo-ku à Tokyo,
et : 8-1, 2-chome, Yaesu, Chuo-Ku à Tokyo (Japon),

repr. par le Cabinet Bede à Bruxelles,

un brevet d'invention pour : Néoschizophyllan du type à conformation
hélicoïdale à trois chaînes, son procédé de préparation
et son application thérapeutique,

Article 2. — Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et
périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit
de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.

Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention
(mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui
de sa demande de brevet.

Bruxelles, le 9 avril 1980.

PAR DÉLÉGATION SPÉCIALE:

L. SALPÊTEUR
Directeur

879373
EC 141

Les sociétés dites : KAKEN CHEMICAL CO., LTD.

à Tokyo (Japon)

et

TAITO CO., LTD.

à Tokyo (Japon)

Néoschizophyllan du type à conformation hélicoïdale à trois chaînes
son procédé de préparation et son application thérapeutique.

9

La présente invention concerne le néoschizophyllan de type à conformation hélicoïdale à trois chaînes, désigné ci-après sous le nom de néoschizophyllan TSH en tant que polysaccharide particulier, ainsi que le procédé pour préparer ledit néoschizophyllan TSH.

Le néoschizophyllan TSH peut être obtenu par traitement du schizophyllan.

Le schizophyllan est un polysaccharide ayant une action anti-tumorale et anti-bactérienne, que l'on peut obtenir par extraction et purification d'une solution de culture de Schizophyllum commune Fries, qui appartient aux Basidiomycètes ou à leur fruit.

La structure, la préparation et l'action anti-tumorale du schizophyllan ont été décrites dans GANN 60, p. 137 à 144 (1969) et dans Japanese Journal of Antibiotics 26, p. 277 à 283 (1973), ainsi que dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3 943 247 qui font bien comprendre lesdites structure, préparation et action anti-tumorale du schizophyllan. Par conséquent, dans le cadre de l'invention, on ne reprend pas la description et les enseignements qui doivent être considérés comme étant ceux du brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3 943 247 et les publications précitées.

Le schizophyllan présente une excellente action antitumorale, comme il est décrit dans l'art antérieur. Toutefois, le schizophyllan est peu soluble dans l'eau et une solution aqueuse de schizophyllan présente une viscosité élevée. Par conséquent, lorsqu'on l'administre par voie orale, l'absorption du schizophyllan est très faible, ce qui ne permet pratiquement pas d'obtenir un effet anti-tumoral.

Afin d'obtenir l'effet thérapeutique souhaité, il est nécessaire d'administrer une grande quantité de solution diluée de schizophyllan et, par conséquent, il est difficile d'administrer le schizophyllan à un être humain par injection.

Dans l'injection sous-cutanée ou dans l'injection intramusculaire du schizophyllan, on provoque une douleur et une induration locale. Dans l'injection intraveineuse du

La présente invention concerne le néoschizophyllan de type à conformation hélicoïdale à trois chaînes, désigné ci-après sous le nom de néoschizophyllan TSH en tant que polysaccharide particulier, ainsi que le procédé pour préparer ledit néoschizophyllan TSH.

Le néoschizophyllan TSH peut être obtenu par traitement du schizophyllan.

Le schizophyllan est un polysaccharide ayant une action anti-tumorale et anti-bactérienne, que l'on peut obtenir par extraction et purification d'une solution de culture de Schizophyllum commune Fries, qui appartient aux Basidiomycètes ou à leur fruit.

La structure, la préparation et l'action anti-tumorale du schizophyllan ont été décrites dans GANN 60, p. 137 à 144 (1969) et dans Japanese Journal of Antibiotics 26, p. 277 à 283 (1973), ainsi que dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3 943 247 qui font bien comprendre lesdites structure, préparation et action anti-tumorale du schizophyllan. Par conséquent, dans le cadre de l'invention, on ne reprend pas la description et les enseignements qui doivent être considérés comme étant ceux du brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3 943 247 et les publications précitées.

Le schizophyllan présente une excellente action antitumorale, comme il est décrit dans l'art antérieur. Toutefois, le schizophyllan est peu soluble dans l'eau et une solution aqueuse de schizopillan présente une viscosité élevée. Par conséquent, lorsqu'on l'administre par voie orale, l'absorption du schizophyllan est très faible, ce qui ne permet pratiquement pas d'obtenir un effet anti-tumoral.

Afin d'obtenir l'effet thérapeutique souhaité, il est nécessaire d'administrer une grande quantité de solution diluée de schizophyllan et, par conséquent, il est difficile d'administrer le schizophyllan à un être humain par injection.

Dans l'injection sous-cutanée ou dans l'injection intramusculaire du schizophyllan, on provoque une douleur et une induration locale. Dans l'injection intraveineuse du

schizophyllan, on provoque l'occlusion des vaisseaux sanguins et d'autres troubles dans l'appareil circulatoire.

Par conséquent, le schizophyllan ne peut pas être utilisé comme médicament.

5 En vue d'obtenir des polysaccharides ayant un effet antitumorale exempt des inconvénients précités, la demanderesse a effectué des recherches concernant de nombreux dérivés et produits de dégradation du schizophyllan. En conséquence de ces recherches, elle a trouvé que, par le traitement aux ultra-
10 sons du schizophyllan, on peut obtenir un nouveau produit dégradé de polysaccharide qui ne présente pas les inconvénients précités et qui a une activité pharmacologique égale ou supérieure à celle du schizophyllan, en présentant par ailleurs une faible toxicité et une basse viscosité sous forme de
15 solution aqueuse. Toutefois, les produits dégradés du schizophyllan contiennent d'autres polysaccharides qui inhibent, ou ne présentent pas, l'effet pharmacologique, en particulier l'effet antitumoral.

La demanderesse a poursuivi ses recherches concernant les
20 polysaccharides présentant une action pharmacologique, en particulier l'effet antitumoral. Ces recherches sont à la base de la présente invention.

Ainsi, le but de l'invention est de préparer un polysaccharide particulier du néoschizophyllan TSH, qui présente une
25 faible viscosité et la viscosité intrinsèque spécifique, sous la forme d'une solution aqueuse et qui puisse être appliqué à des fins thérapeutiques.

Selon un autre objectif de l'invention, on propose un polysaccharide particulier du néoschizophyllan TSH, qui présente
30 une faible toxicité.

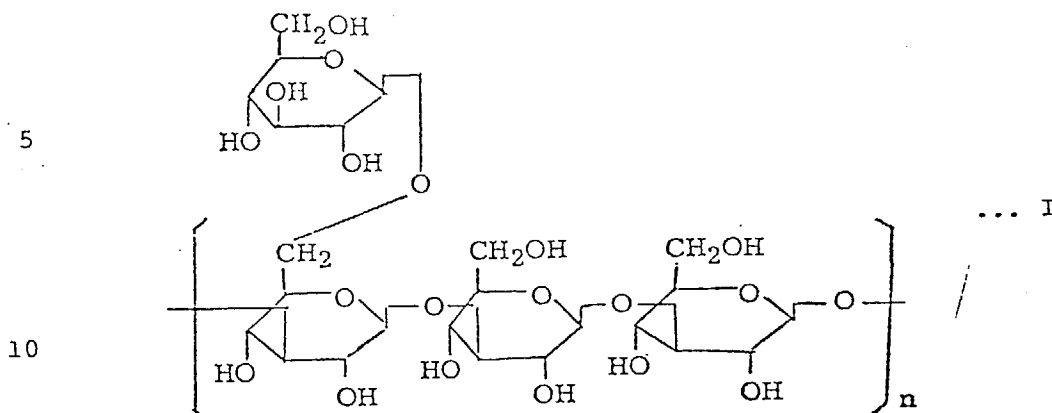
L'invention vise encore un polysaccharide spécifique du néoschizophyllan TSH.

Les objectifs précités de l'invention sont atteints par un traitement aux ultrasons du schizophyllan dans des conditions
35 particulières et une précipitation par addition d'un solvant hydrophile particulier à la solution colloïdale de schizophyllan ainsi traité aux ultrasons, à une concentration particulière.

Le néoschizophyllan du type à conformation hélicoïdale à trois chaînes est un polysaccharide particulier dont

3 879373

la structure de base des motifs répondant à la formule I suivante :



qui présente une viscosité intrinsèque de 0,5 à 20, en particulier 1 à 8 et qui ne contient pratiquement pas d'autre type de polysaccharide .

On prépare le néoschizophyllan du type à conformation hélicoïdale à trois chaînes en dissolvant le schizophyllan dans l'eau pour obtenir une solution colloïdale et en soumettant à un traitement aux ultrasons la solution aqueuse colloïdale de schizophyllan ainsi obtenue sans augmenter son pH à une valeur supérieure à 10, pour former une solution, puis en ajoutant un solvant hydrophile choisi dans le groupe comprenant des alcools en $C_1 - C_3$ des cétones en $C_3 - C_5$ et le tétrahydrofuranne à la solution aqueuse résultant du traitement aux ultrasons, de façon à ce que ladite addition comprenne 20 à 40% en volume dudit solvant hydrophile par rapport au total formé par le solvant et l'eau. Il en résulte la précipitation du néoschizophyllan du type à conformation hélicoïdale à trois chaînes, que l'on sépare du milieu. Après addition du solvant à la solution de schizophyllan, on chauffe de préférence la solution obtenue jusqu'à ce que le précipité se dissolve, puis on la refroidit pour obtenir un précipité du néoschizophyllan TSH hautement purifié. On sépare le précipité par centrifugation et on le dissout dans de l'eau, on concentre la solution obtenue pour réaliser l'évaporation du solvant, avant de filtrer ladite solution sur membrane.

Le néoschizophyllan du type à conformation hélicoïdale à trois chaînes (néoschizophyllan TSH) est une nouvelle sorte de schizophyllan qui ne contient pas d'autres types de polysaccharides, mais renferme par contre le polysaccharide du type à

079073

4 conformation hélicoïdale à trois chaînes contenant les motifs principaux de formule I et présentant une viscosité intrinsèque de 0,5 à 20, généralement de 1 à 8, en particulier de 3 à 8, que l'on sépare par addition du solvant hydrophile spécifique à la solution obtenue par traitement aux ultrasons de la solution aqueuse colloïdale de schizophyllan, de façon à obtenir 20 à 40% en volume dudit solvant hydrophile par rapport au total du solvant et de l'eau, en précipitant ainsi ledit schizophyllan TSH. Le type et la concentration du solvant hydrophile particulier sont des facteurs importants, de même que les conditions du traitement ultrasonore d'une solution aqueuse colloïdale du schizophyllan, pour la préparation du néoschizophyllan TSH.

Lorsqu'on dissout le schizophyllan une première fois en vue de former une conformation à une seule chaîne, il est difficile de former la conformation hélicoïdale à trois chaînes, mais on obtient, au contraire, un gel.

Le néoschizophyllan TSH a les caractéristiques particulières suivantes, de même que la conformation hélicoïdale à trois chaînes et la viscosité intrinsèque spécifique.

Les propriétés pharmacologiques du néoschizophyllan TSH sont nettement différentes de celles du schizophyllan.

La toxicité du néoschizophyllan TSH est remarquablement faible par comparaison à celle du schizophyllan. Par exemple, la DL_{50} (par voie intraveineuse) du schizophyllan est de 30mg/kg alors que la DL_{50} (par voie intraveineuse) du néoschizophyllan TSH est de 730 mg/kg.

Comme montré dans l'Essai 1 suivant, la dose optimale de schizophyllan est supérieure à 2 mg/kg, tandis que la dose optimale du néoschizophyllan TSH est inférieure à 2 mg/kg pour la manifestation de l'effet le meilleur.

Lorsqu'on dégrade chimiquement ou enzymatiquement le schizophyllan respectivement par un acide ou une enzyme, l'effet pharmacologique diminue et, dans la plupart des cas, on ne peut pas obtenir un produit dégradé homogène.

En conséquence, le néoschizophyllan TSH est tout à fait différent des produits dégradés, obtenus par les procédés chimiques ou enzymatiques.

Les propriétés physiques du néoschizophyllan TSH sont les suivantes :

1) Poudre blanche, pas de goût, pas d'odeur

9

879073

- 2) Structure de base : (telle qu'établie ci-dessus)
- 3) Poids moléculaire moyen : 106 000-630 000
(viscosité intrinsèque de 1 à 8) (schizophyllan :
5 000 000-7 000 000)
- 5 4) Analyse élémentaire : Pas d'azote
Le rapport C/H est d'environ 6/1
- 5) Viscosité intrinsèque : 1 à 8 (dl/g)
(Schizophyllan : 100 à 200 (dl/g)
- 6) Coefficient de sédimentation : $S_{20,w}$ 6-8 (diagramme de
10 Schlieren)
(Schizophyllan 10 à 13)
- 7) Réactions colorées :
Négative pour la réaction à l'iode ; positive pour les
réactions de Molish, à l'acide phénol sulfurique et à
15 l'anthrone.
- 8) Solubilité :
Un gramme de néoschizophyllan TSH se dissout complète-
ment dans 9 ml d'eau après une agitation de dix
minutes à la température ambiante, alors que le schizo-
20 phyllan demeure non dissous même après une agitation
d'une heure dans les mêmes conditions.
- 9) DL_{50} (souris)
- | | Néoschizophyllan TSH | Schizophyllan |
|---------|----------------------|---------------|
| i.v. | 718 mg/kg | 30 mg/kg |
| 25 i.p. | > 2000 mg/kg | > 250 mg/kg |
| i.m. | > 100 mg/kg | - |
| s.c. | > 2000 mg/kg | - |
| p.o. | > 1000 mg/kg | - |
- 30 La viscosité intrinsèque du schizophyllan est d'environ
100 à 200 (dl/g) tandis que la viscosité intrinsèque du
néoschizophyllan TSH est d'environ 1 à 3 (dl/g).
- Le néoschizophyllan TSH est tout à fait différent du
schizophyllan, ce dernier présentant une conformation en pelote à
35 structure aléatoire ou en gel. L'effet antitumoral du néoschizophyllan
TSH est relativement supérieur à celui du schizophyllan. Les
effets secondaires du néoschizophyllan TSH sont relativement
plus faibles que ceux du schizophyllan, du fait de la présence
du polysaccharide particulier de poids moléculaire uniforme.
- Le néoschizophyllan TSH présente des effets pharmacologiques

stables, en raison de la présence d'impuretés moindres, de la conformation hélicoïdale à trois chaînes et du poids moléculaire uniforme.

Les produits obtenus par traitement du schizophyllan aux ultrasons renferment des impuretés, tels que d'autres polysaccharides, des saccharides, des protéines, des composés azotés, par exemple des amino-acides, des résidus ou cendres et également des produits de traitement du schizophyllan aux ultrasons, ayant divers poids moléculaires. On peut éliminer les impuretés de faible poids moléculaire, par une méthode d'échange d'ions, une dialyse, une ultrafiltration et une méthode d'osmose inverse,

mais on ne peut pas séparer, par contre, aisément les polysaccharides par ces méthodes. Le produit obtenu par traitement du schizophyllan aux ultrasons contient d'autres polysaccharides dont les poids moléculaires sont voisins des poids moléculaires du néoschizophyllan TSH, et qui sont des molécules fibreuses contenant des groupes polaires. On ne peut pas séparer aisément ces autres polysaccharides par lesdites méthodes. On sait que l'on peut séparer les composés macromoléculaires par une chromatographie par pénétration sur gel, en utilisant, entre autres, des produits mis sur le marché sous le nom de Sephadex, Sephalose, et des perles de verre poreux. Toutefois, le néoschizophyllan TSH présente une viscosité élevée, si bien que l'on ne peut pas obtenir ledit néoschizophyllan TSH par cette méthode.

On peut par contre obtenir le néoschizophyllan TSH par l'addition d'un solvant hydrophile spécifique choisi dans le groupe comprenant des alcools en $C_1 - C_3$, des cétones en $C_3 - C_5$ et le tétrahydrofurane, a une solution obtenue par le traitement des schizophyllan aux ultrasons sans augmenter le pH à une valeur supérieure à 10, en obtenant ainsi le précipité de néoschizophyllan TSH.

On peut utiliser ledit solvant en mélange, mais le rapport volumétrique entre le solvant et le total formé par le solvant et l'eau (solution) est toutefois limité à 20-40% en volume.

Lorsqu'on dissout le schizophyllan dans l'eau à un pH supérieur à 10 ou lorsque la solution obtenue par le traitement aux ultrasons, présente un pH supérieur à 10, la conformation en pelote à structure aléatoire du schizophyllan se transforme en une conformation en gel, quand on le neutralise par un acide.

Lorsqu'on dissout le schizophyllan dans le diméthylsulfoxyde

7. 879070

il prend la forme d'une pelote à structure aléatoire pour se transformer ultérieurement en gel par dilution avec de l'eau.

On a étudié dans le cadre de l'invention les relations entre la viscosité intrinsèque $[\eta]$ et le poids moléculaire moyen $[P_M]$ du néoschizophyllan TSH dans le diméthylsulfoxyde 5 dans l'eau. Le poids moléculaire du produit de l'invention, mesuré par la méthode d'ultracentrifugation, est d'environ trois fois celui du produit antérieur obtenu en utilisant le diméthylsulfoxyde.

L'indice α dans $[\eta] = KM_W^\alpha$ est de 1,7 dans le produit de 10 l'invention et de 0,68 dans le produit antérieur obtenu en utilisant le diméthylsulfoxyde. Ces faits montrent que le produit de l'invention possède une conformation hélicoïdale à trois chaînes.

On peut effectuer le traitement aux ultrasons dans 15 diverses conditions.

Le rendement du traitement aux ultrasons peut être donné par l'équation suivante :

$$W = 2 \pi^2 \rho C (FA)^2$$

dans laquelle

20 W : rendement par unité de surface

ρ : densité de la solution

C : vitesse du son dans la solution

F : fréquence

A : amplitude.

25 Dans le traitement aux ultrasons, la concentration de la solution de schizophyllan est habituellement supérieure à 0,1% en poids, de préférence à 0,5% en poids. Lorsque la concentration du schizophyllan est élevée, ledit schizophyllan ne se dissout pas et la viscosité reste élevée, ce qui diminue l'effet 30 du traitement aux ultrasons. Par suite, elle est habituellement inférieure à 5% en poids.

Dans le traitement par ultrasons, il est préférable d'assurer une grande amplitude, c'est-à-dire 5 à 500 microns, en particulier 10 à 200 microns, sous la fréquence de 5 à 50 KHz 35 de 8 à 30 KHz. Il est préférable d'assurer une amplitude supérieure, encore qu'il faille considérer qu'une corrosion de la plaque vibrante et d'autres perturbations de l'appareil puissent se produire dans le cas d'une amplitude élevée. Lorsque la fréquence est trop faible, il en résulte un bruit tandis lorsque

la fréquence est trop élevée, on ne peut pas obtenir une amplitude souhaitée.

Dans le traitement aux ultrasons, l'énergie totale produite est habituellement de 0,1 à 50 watts-heure pour 1 cm³, et plus particulièrement de 0,5 à 10 watts-heure pour 1 cm³, de la dispersion colloïdale de schizophyllan. Lorsque la concentration de schizophyllan est faible, le rendement énergétique total obtenu peut être faible.

Il est préférable de recycler la solution dans le traitement aux ultrasons, de telle sorte que ladite solution soit mise en contact d'une manière uniforme avec la plaque vibrante.

Dans le traitement aux ultrasons, il est préférable de choisir la forme du récipient, de telle façon que l'on mette en contact d'une manière efficace et uniforme, les molécules de schizophyllan avec la surface de la plaque vibrante ou de munir l'appareil d'un agitateur désiré.

Les conditions optimales dépendent de la concentration du schizophyllan, de la fréquence d'oscillations, du rendement, de la forme et la dimension du récipient et de l'agitateur.

Habituellement, lorsque l'on traite aux ultrasons 2 litres de solution colloïdale de schizophyllan à 1,5%, il suffit de lui appliquer une énergie de 500 W pendant six à huit heures. Lorsque l'on augmente la quantité de la solution et la concentration du schizophyllan, on peut prolonger le temps de traitement aux ultrasons proportionnellement aux augmentations. Lorsque des particules en suspension sont contenues dans la solution, il faut envisager une atténuation de l'énergie. Le temps de traitement aux ultrasons doit être prolongé lorsque l'agitation n'est pas suffisante ou lorsque la solution renferme des bulles.

Lorsque l'énergie de traitement aux ultrasons est trop faible, celle-ci ne suffit pas pour transformer le schizophyllan si bien qu'il subsiste du schizophyllan proprement dit et du schizophyllan faiblement dégradé. Pour l'utilisation en tant que médicament, il n'est pas toujours nécessaire de les séparer, lorsque les quantités restantes de schizophyllan et de schizophyllan faiblement dégradées, sont faibles.

Dans la précipitation du néoschizophyllan TSH à partir de la solution obtenue par le traitement du schizophyllan aux ultrasons, on doit respecter les conditions suivantes :

La concentration de la solution obtenue par le traitement

9 00000

du schizophyllan aux ultrasons est définie de la manière suivante :

$$[\eta]^{1/2} = 0,1 \text{ à } 10$$

$$\text{de préférence } [\eta]^{1/2} = 0,5 \text{ à } 5$$

$[\eta]$ étant la viscosité intrinsèque (dl/g) du produit,

5 et C la concentration du schizophyllan (% en poids).

Lorsque la concentration est trop élevée, les distances
entre les molécules de néoschizophyllan TSH et les autres poly-
saccharides sont trop courtes pour entraîner une action mutuelle,
si bien que la formation et la séparation du néoschizophyllan
10 TSH ne sont pas satisfaisantes. Lorsque la concentration est
trop faible, la quantité du solvant hydrophile particulier
se trouve accrue et la taille de l'appareil doit être agrandie,
ce qui entraîne, des difficultés pour la mise en oeuvre indus-
trielle.

15 Les solvants hydrophiles spécifiques utilisés dans la
préparation du néoschizophyllan TSH, sont miscibles à l'eau et
ont une action faiblement dissolvante vis-à-vis du néoschizo-
phyllan TSH, de sorte qu'on peut les séparer complètement dudit
néoschizophyllan TSH, lesdits solvants ayant encore un faible
20 point d'ébullition et une faible toxicité.

On ajoute graduellement le solvant hydrophile spécifique,
à la solution obtenue par le traitement aux ultrasons, jusqu'à
ce que le rapport volumétrique entre le solvant et le total
formé par le solvant et l'eau (solution) atteigne 20 à 40% en
25 volume, de préférence 30 à 40% en volume. Lorsque ledit rapport
est inférieur à 20% en volume, le néoschizophyllan TSH ne pré-
cipite pratiquement pas, alors que lorsque ledit rapport est supérieur
à 40% en volume on obtient un produit impur contenant les
autres polysaccharides.

30 La température utilisée dans le traitement est de préfé-
rence comprise dans l'intervalle de 0°C à 40°C, en particulier
10 à 35°C. On n'obtient pas le néoschizophyllan TSH de façon
satisfaisante à une température supérieure à 40°C dans le trai-
tement par le solvant hydrophile particulier, car la solubilité
35 du produit devient trop élevée dans la solution obtenue avec
le solvant.

Il est préférable d'ajouter le solvant hydrophile parti-
culier à la concentration spécifique pour obtenir le précipité
de néoschizophyllan TSH, puis de chauffer le mélange à 45°C-75°C

de façon à dissoudre le néoschizophyllan TSH sans variation notable de la concentration du solvant, et de refroidir ensuite la solution à 10°C-35°C de façon à précipiter le néoschizophyllan TSH de pureté plus élevée.

5 Le traitement de la solution, obtenue par application des ultrasons, à l'aide du solvant hydrophile particulier dans le rapport spécifique est très important pour obtenir le néoschizophyllan TSH. La conformation hélicoïdale à trois chaînes se forme par le traitement au solvant hydrophile particulier dans le rapport spécifique. On sépare, de préférence, le
10 néoschizophyllan TSH par centrifugation. On peut effectuer la filtration sur membrane de la solution, avant l'addition du solvant hydrophile particulier.

On peut dissoudre le néoschizophyllan TSH dans de l'eau
15 ou dans une solution aqueuse, telle qu'une solution saline. Si cela est nécessaire, on applique un traitement par ultrasons pour dissoudre le néoschizophyllan TSH. Les conditions de ce traitement doivent alors être modérées.

On peut encore traiter la solution de néoschizophyllan
20 TSH par la filtration sur membrane, opération requise pour la préparation d'un médicament. On peut utiliser un filtre millipore.

Suivant la caractéristique préférée de l'invention, on soumet le précipité de néoschizophyllan TSH, formé par l'addition d'une proportion spécifique du solvant hydrophile particulier, à une séparation par centrifugation.
25

Le précipité séparé contient une faible quantité du solvant particulier.

On dissout le précipité dans de l'eau ou dans une solution saline, avec ou sans séchage dudit précipité. On peut
30 éliminer le solvant spécifique restant, en concentrant la solution au cas où du solvant demeure dans la solution.

On filtre la solution de néoschizophyllan TSH sur filtre à membrane, de façon à séparer les germes tels que les bactéries, en particulier des germes produisant des effets
35 pyrogènes. On peut utiliser le filtrat comme solution injectable. On peut en outre concentrer le filtrat et le sécher, puis dissoudre le néoschizophyllan TSH pulvérulent dans une solution saline pour obtenir une solution injectable.

La caractéristique importante de l'invention consiste à

éliminer le solvant hydrophile spécifique à partir de la solution de néoschizophyllan TSH, avant la filtration sur membrane.

Les autres avantages de l'invention résident dans le fait que celle-ci permet de préparer une solution ayant une concentration élevée de néoschizophyllan TSH. La concentration maximale d'une solution de schizophyllan est d'environ 0,4%, alors qu'il est facile de préparer une solution de néoschizophyllan TSH à 3 - 5% sans aucune difficulté dans le cadre de la préparation d'un médicament.

10 Il est possible de préparer une solution pour médicament, ayant une faible viscosité et une concentration élevée, en utilisant le néoschizophyllan TSH, de sorte que les inconvénients du schizophyllan dans la préparation d'un médicament peuvent être ainsi évités de façon satisfaisante.

15 L'avantage le plus important conféré par l'invention, est l'obtention d'un nouveau composé de néoschizophyllan TSH qui présente une excellente activité pharmacologique et qui montre une toxicité remarquablement faible.

Le néoschizophyllan TSH est absorbé dans le sang et les 20 tissus, plus rapidement que le schizophyllan.

On peut également utiliser le néoschizophyllan TSH comme intermédiaire pour la préparation de divers dérivés.

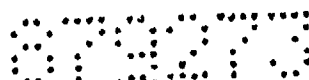
On peut administrer le néoschizophyllan TSH de l'invention suivant diverses méthodes, telles qu'une administration par 25 voie orale, une injection sous-cutanée, une injection intramusculaire et une injection intraveineuse.

On peut doser le néoschizophyllan TSH sous toutes formes désirées, tels qu'un comprimé, une capsule, une solution injectable, un sirop ou d'autres compositions pharmaceu- 30 tiques.

On peut combiner le néoschizophyllan TSH avec un autre médicament antitumorale, tel que la Mitomycine C, le 5-Fluorouracil, la 6-Mercaptopurine, le Cytosine-arabinoside, la Bléomycine, entre autres.

35 La dose de néoschizophyllan TSH est habituellement comprise entre 0,005 et 10 mg/kg/jour, de préférence entre 0,05 et 2 mg/kg/jour. La concentration de la solution injectable est est de préférence de 0,05 à 4%.

L'invention sera maintenant illustrée avec plus de détails



par certains exemples, nullement destinés à limiter ladite invention dans son cadre et son esprit.

EXEMPLE 1 :

On disperse dans 500 ml d'eau chaude, une quantité de
5 10 g d'une poudre de schizophyllan qui a été préparée par
précipitation par addition d'un solvant organique miscible
à l'eau à un filtrat de culture purifié de Schizophyllum
commune Fries.

On traite la solution colloïdale de schizophyllan par
10 des ultrasons, sous une fréquence d'oscillations de 20 KHz,
avec une amplitude de 20 microns et une énergie de 100 W,
en agitant la solution de telle sorte qu'il se produise un
contact uniforme avec la plaque vibrante sans production de
bulles.

15 L'alimentation du réservoir en solution colloïdale de
schizophyllan se fait par le fonds dudit réservoir, tandis que
l'on recueille l'écoulement de trop plein à la partie supérieure
du réservoir. On plonge la plaque vibrante dans la solution
colloïdale de façon à appliquer les ultrasons à ladite solution
20 colloïdale avant son écoulement à la partie supérieure, si
bien que ladite application des ultrasons se fait en continu
en formant une solution du produit ayant une viscosité intrin-
sèque de 4,6 (dl/g).

On ajoute goutte à goutte 280 ml d'acétone à 500 ml de la
25 solution du produit (10 g) (36% en volume d'acétone) en obte-
nant ainsi la précipitation du néoschizophyllan TSH. On sépare
le précipité par un dispositif centrifugeur à 5 000 tours par minute et
on sèche le précipité ainsi séparé, en obtenant 8,4 g de néo-
schizophyllan TSH en poudre, ayant une viscosité intrinsèque de
30 5,1 (dl/g). On confirme la conformation hélicoïdale à trois
chaînes du produit par la méthode décrite ci-dessus.

On concentre et on sèche le surnageant séparé par
centrifugation, en obtenant un composant
solide ayant une viscosité intrinsèque de 1,5 (dl/g).

EXEMPLE 2 :

35 On dissout 2 g de poudre de schizophyllan de l'exemple 1,
dans 100 ml d'eau et on traite la solution colloïdale obtenue,
par des ultrasons à fréquence d'oscillations de 20 KHz avec une
amplitude de 20 microns et une énergie de 1 KW à la température

ambiante, en agitant, de façon à obtenir la solution du produit ayant une viscosité intrinsèque de 5,9 (dl/g).

On ajoute goutte à goutte 45 ml de tétrahydrofurane, à 100 ml de la solution du produit (2 g) (31% en volume de tétrahydrofurane), en obtenant ainsi la précipitation du néoschizophyllan TSH. On sépare le précipité par centrifugation à 5 000 tours par minute et on sèche le précipité ainsi séparé, en obtenant 0,9 g de néoschizophyllan TSH en poudre ayant une viscosité intrinsèque de 7,1 (dl/g).

10 On concentre et sèche le surnageant, séparé par la méthode de séparation centrifuge, en obtenant un composant solide ayant une viscosité intrinsèque de 2,7 (dl/g).

EXEMPLE 3 :

En se conformant au mode opératoire de l'exemple 1, excepté 15 que l'on varie le type de solvant destiné à l'addition à la solution obtenue par traitement aux ultrasons, on effectue l'addition du solvant et la séparation du néoschizophyllan TSH. Les résultats obtenus sont les suivants :

20	Solvant	Rapport du solvant à la solution totale	Produit obtenu à partir du précipité
	Méthanol	37,2	9,2
	Ethanol	32,1	6,2
25	Propanol	26,9	4,8
	Diéthylcétone	25,6	3,1
	Ethylpropylcétone	21,8	1,3

30 EXEMPLE 4 :

On dissout dans 1 litre d'eau, 10 g de schizophyllan brut, qui contient 63 mg de cendre, 8 mg d'azote et 670 mg de polysaccharide différent du schizophyllan, et on traite la solution obtenue par ultrasons, puis on la sèche. On dissout dans chaque 35 cas 5 g du produit résultant, chaque fois dans 250 ml d'eau, séparément. On verse 160 ml d'acétone dans chaque solution obtenue, en procédant goutte à goutte, et on sépare le précipité obtenu par centrifugation avant de la sécher, en obtenant 4,5 g de néoschizophyllan TSH ayant une viscosité intrinsèque

qui s'élève à 7,2 (dl/g). On récupère 0,3 g du composant ayant une viscosité intrinsèque de 2,8 (dl/g) à partir du surnageant, ce composant contenant 26 mg de cendre, 2 mg d'azote et 255 mg de polysaccharide impur.

5 D'une manière similaire, on verse 160 ml d'acétone dans l'autre solution. On chauffe la solution à 66°C jusqu'à ce que le précipité se dissolve parfaitement, puis on la laisse reposer pendant une nuit pour la refroidir à 25°C. On obtient par centrifugation et séchage à partir de la solution, 4,6 g de
10 néoschizophyllan TSH dont la viscosité intrinsèque est de 7,5 (dl/g). On récupère à partir du surnageant, 0,4 g d'un solide ayant une viscosité intrinsèque de 2,5 (dl/g), ce solide contenant 27,2 mg de cendre, 2,8 mg d'azote et 296,8 mg de polysaccharide impur.

15 EXEMPLE 5 :

On dissout respectivement les néoschizophyllan TSH obtenus dans les exemples 1 et 3, dans une solution saline physiologique à la concentration de 10 g/litre et on procède au traitement par ultrasons de chaque dispersion, par le mode opératoire de
20 l'exemple 1. On obtient chaque solution de schizophyllan TSH. On peut utiliser ces solutions pour injection.

On présente ci-après certains exemples de compositions de néoschizophyllan TSH.

Préparation 1 (solution injectable).

25 On chauffe et on dissout dans 100 ml, 0,5 g de néoschizophyllan TSH et 0,9 g de chlorure de sodium. On filtre la solution sur une membrane ayant une dimension de pore de 0,45 micron et on remplit à l'aide de la solution ainsi filtrée chaque ampoule pour préparer une solution pour injection.

30 Préparation 2 (sirop) :

On dissout par chauffage dans 100 ml d'eau 3,0 g de néoschizophyllan TSH, 20 g de sucre, 0,03 g de para-hydroxybenzoate de méthyle et 0,01 g para-hydroxybenzoate de propyle.

On effectue aisément la filtration sur membrane. Cette
35 filtration sur membrane est indispensable.

ESSAI 1 :

On compare l'effet antitumorale du néoschizophyllan TSH sur une tumeur de Sarcome 180, en comparaison avec celui du schizophyllan.

L'essai est effectué par la méthode indiquée dans GANN, 60, p. 137 à 144 (1969) précité.

On administre la solution à des souris par injection intramusculaire à raison de 10 à la fois tous les deux jours, 24 5 heures après la transplantation de la tumeur. Les résultats sont représentés dans le tableau suivant.

Comme on peut le voir clairement d'après les résultats dudit tableau, le néoschizophyllan TSH présente un effet supérieur par rapport aux produits obtenus par traitement aux 10 ultrasons de la dispersion de schizophyllan.

Tableau

	Dose mg/kg x fois	0,1x10	0,2x10	0,5x10	1,0x10	2,0x10	5,0x10
15	Nombre de souris	20	20	20	20	20	20
	<u>Taux d'inhibition tumorale (%)</u>						
20	Groupe recevant le schizophyllan traité par ultrasons	71,4	81,5	97,0	97,9	95,8	65,8
	Groupe recevant le néoschizophyllan TSH	82,5	90,0	98,3	94,7	94,5	80,6
	Exp. 1						
25	Groupe recevant le néoschizophyllan TSH	80,1	89,8	98,3	97,6	96,5	80,9
	Exp. 2						
	Témoin	0	0	0	0	0	0
30	<u>Nombre de tumeurs disparues chez les souris</u>						
	Groupe recevant le schizophyllan traité par ultrasons	2	4	11	10	9	3
35	Groupe recevant le néoschizophyllan TSH	3	8	14	12	10	6
	Exp. 1						
	Groupe recevant le néoschizophyllan TSH	3	8	13	12	11	5
	Exp. 2						
	Témoin	0	0	0	0	0	0

REVENDICATIONS

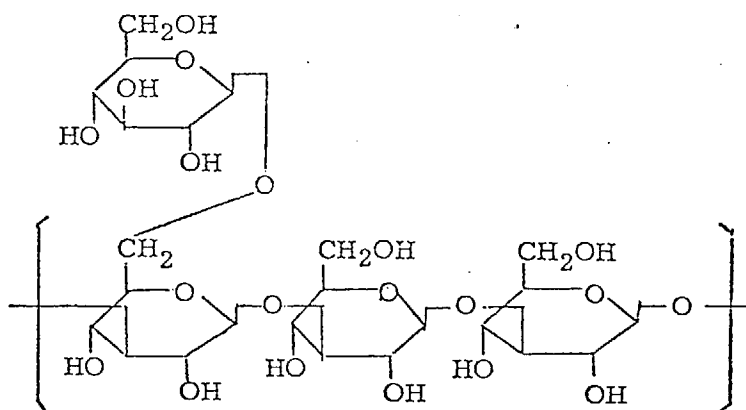
1) Néoschizophyllan du type à conformation hélicoïdale à trois chaînes, tel que produit par traitement aux ultrasons d'une solution colloïdale de schizophyllan et précipitation fractionnée par un solvant hydrophile.

2) Néoschizophyllan du type à conformation hélicoïdale à trois chaînes, caractérisé par le fait qu'il présente des unités de formule I suivante:

10

15

20



25 et qu'il a une viscosité intrinsèque de 1 à 8.

3) Procédé pour préparer le néoschizophyllan du type à conformation hélicoïdale à trois chaînes, caractérisé par le fait que l'on traite une solution colloïdale de schizophyllan par ultrasons à une fréquence de 8 à 60 KHz. en agitant, sans augmenter le pH à une valeur supérieure à 10, on procède à l'addition d'un solvant hydrophile, choisi parmi le groupe comprenant les alcools en C₁ - C₃, les cétones en C₃ - C₅ et le tétrahydrofurane à la solution aqueuse résultant du traitement par ultrasons, en obtenant 20 à 40% en volume dudit solvant hydrophile par rapport au total formé par le solvant et l'eau, et en ce que l'on effectue la séparation du précipité de néoschizophyllan du type à conformation hélicoïdale à trois chaînes.

4) Procédé suivant la revendication 3, caractérisé par le

fait que la solution colloïdale de schizophyllan a une concentration donnée par l'équation :

5
$$C = \frac{0,1 \text{ à } 10}{[\eta]^{1/2}}$$
 dans laquelle $[\eta]^{1/2}$: viscosité intrinsèque du schizophyllan (dl/g) ; C : concentration (% en poids).

5) Procédé suivant la revendication 4, caractérisé par le fait que la concentration est :

10
$$C = \frac{0,5 \text{ à } 5}{[\eta]^{1/2}}$$

6) Procédé suivant la revendication 3, caractérisé par le fait que l'on effectue le traitement aux ultrasons à une fréquence de 8 à 60 KHz et avec une amplitude de 5 à 500 microns.

15 7) Procédé suivant la revendication 3, caractérisé par le fait que l'on dissout le précipité de néoschizophyllan du type à conformation hélicoïdale à trois chaînes, dans de l'eau ou dans une solution aqueuse, que l'on élimine le solvant hydrophile particulier restant, avant ou après la dissolution

20 et on filtre la solution sur membrane.

8) Composition pharmaceutique, notamment utile comme médicament antitumoral, caractérisée par le fait qu'elle comprend le néoschizophyllan du type à conformation hélicoïdale à trois chaînes ayant un poids moléculaire moyen de 106 000 -

25 630 000 en association avec un véhicule pharmaceutique convenable.

Bruxelles, le 9 octobre 1979

P.PON. : KAKEN CHEMICAL CO., LTD. et TAITO CO., LTD.

P.PON. : Cabinet BEDE, R. van Schoonbeek

