



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑤① Int. Cl.³: A 61 K 39/12
A 61 K 39/106

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

⑪

633 447

⑳ Numéro de la demande: 9701/78

㉔ Date de dépôt: 18.09.1978

㉓ Priorité(s): 19.09.1977 FR 77 28162

㉔ Brevet délivré le: 15.12.1982

㉔ Fascicule du brevet
publié le: 15.12.1982

㉔ Titulaire(s):
Institut Mérieux, Lyon (FR)

㉔ Inventeur(s):
Jean-Louis Tayot, La-Tour-de-Salvagny (FR)
Marie-Claude Mynard, Ste Foy-les-Lyon (FR)

㉔ Mandataire:
Pierre Ardin & Cie, Genève

⑤④ **Matériau particulier thérapeutiquement actif, sa préparation et son utilisation comme médicament.**

⑤⑦ Le matériau particulier est constitué de particules-supports revêtues d'une première couche constituée par un ganglioside ou un dérivé de ganglioside doué d'affinité pour la toxine cholérique et d'une deuxième couche constituée par de la toxine cholérique.

Il est utilisable notamment comme médicament contre le choléra.

REVENDECATIONS

1. Matériau particulaire thérapeutiquement actif, caractérisé par le fait qu'il est constitué de particules-supports revêtues d'une première couche constituée par un ganglioside ou un dérivé de ganglioside doué d'affinité pour la toxine cholérique et d'une deuxième couche constituée par de la toxine cholérique.

2. Matériau selon la revendication 1, caractérisé par le fait que les particules-supports sont choisies dans le groupe constitué par des hématies, des germes bactériens, notamment des vibrions cholériques inactivés des polymères organiques capables d'être maintenus en suspension stable dans l'eau, tels que des latex synthétiques ou naturels, des particules de charbon, des particules de polysaccharides, ou de polysaccharides modifiés, et des particules minérales poreuses revêtues de polysaccharides, ou de polysaccharides modifiés, éventuellement réticulés.

3. Matériau selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par le fait que le ganglioside ou le dérivé de ganglioside est choisi dans le groupe constitué par le ganglioside G_{M1} , le lysoganglioside G_{M1} , les produits d'hydrolyse partielle du ganglioside G_{M1} , et le mono- ou asialogangliosides résultant du traitement acide des gangliosides ou de leurs dérivés.

4. Procédé de préparation du matériau selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par le fait que, dans un premier stade, on fixe le ganglioside et/ou le dérivé de ganglioside sur les particules-supports, puis, dans un deuxième stade, caractérisé par le fait qu'on fixe la toxine cholérique sur les particules revêtues de ganglioside ou de dérivé de ganglioside.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé par le fait que pour fixer la couche de toxine cholérique, on laisse en contact les particules revêtues de ganglioside et/ou de dérivé de ganglioside pendant un temps suffisant pour obtenir une saturation ou, si désiré, un recouvrement partiel du ganglioside par la toxine.

6. Procédé selon l'une des revendications 4 ou 5, caractérisé par le fait que le matériau-support est constitué par des hématies préalablement traitées avec un dérivé carbonyle.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé par le fait que, pour fixer le ganglioside G_{M1} sur les hématies préalablement traitées avec le dérivé carbonyle, on ajoute à un pH supérieur ou égal à 8, et de préférence voisin de 13, une solution de ganglioside à une suspension d'hématies ainsi traitées.

8. Procédé selon la revendication 6, caractérisé par le fait que, pour fixer le lysoganglioside G_{M1} à une suspension d'hématies préalablement traitée par un dérivé carbonyle, on ajoute à la suspension de globules rouges ainsi traitée une solution de lysoganglioside G_{M1} à pH supérieur à 5.

9. Procédé selon l'une des revendications 4 ou 5, caractérisé par le fait que l'on utilise comme support des particules bactériennes.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé par le fait que les particules bactériennes sont des vibrions cholériques.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé par le fait que les vibrions cholériques sont préalablement inactivés par un dérivé carbonyle.

12. Procédé selon l'une des revendications 4 ou 5, caractérisé par le fait que les particules-supports sont des polymères organiques susceptibles d'être maintenus en suspension stable dans l'eau.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé par le fait que lesdits polymères organiques sont à base de monomères vinyliques tels que le styrène, le butadiène ou le divinylbenzène.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 ou 5, caractérisé par le fait que les particules-supports sont des particules de charbon.

15. Procédé selon l'une des revendications 4 ou 5, caractérisé par le fait que les particules-supports sont des particules de polysaccharides ou des particules de polysaccharides modifiés.

16. Procédé selon l'une des revendications 4 ou 5, caractérisé par le fait que les particules-supports sont des particules minérales poreuses revêtues de polysaccharides ou de polysaccharides modifiés.

17. Médicament, caractérisé par le fait qu'il contient comme ingrédient actif un matériau particulaire selon l'une des revendications 1 à 3.

La présente invention a pour objet un matériau particulaire thérapeutiquement actif, sa préparation et son utilisation comme médicament.

On sait que pour une prévention efficace du choléra, il est nécessaire d'acquérir une bonne immunité vis-à-vis de la toxine cholérique.

Le matériau particulaire susdit est capable notamment d'induire une immunité et une synthèse d'anticorps antitoxine cholérique lorsqu'ils sont administrés à un organisme vivant possédant un système de défense immunitaire.

Ce matériau est caractérisé en ce qu'il est constitué de particules-supports revêtues d'une première couche constituée par un ganglioside, ou un dérivé de ganglioside, doué d'affinité pour la toxine cholérique et d'une deuxième couche constituée par de la toxine cholérique.

Les particules utilisées comme supports peuvent être des hématies d'espèces animales quelconques, des germes bactériens quelconques, en particulier des vibrions cholériques du type Inaba ou du type Ogawa, des particules de polymères organiques tels que le latex synthétique ou naturel, des particules de charbons granulaires ou colloïdaux, des particules de polysaccharides ou de polysaccharides modifiés, des particules minérales poreuses revêtues de polysaccharides et de polysaccharides modifiés, et de façon générale tout autre type de particules auxquelles s'applique au moins l'un des procédés de fixation du ganglioside ou de ses dérivés décrits ci-après.

Les particules minérales poreuses mentionnées ci-dessus sont notamment des oxydes métalliques tels que la silice, l'alumine, la magnésie, l'oxyde de titane, ou leurs dérivés synthétiques ou naturels tels que les verres, les silicates, les borosilicates ou le kaolin.

Dans le présent exposé, on désigne par l'expression toxine cholérique non seulement la forme toxique proprement dite ou choléragène, mais aussi la forme non toxique appelée choléragénoloïde. On sait que le choléragène se transforme naturellement et progressivement, ou encore sous l'action de la chaleur, en choléragénoloïde. Le choléragène et le choléragénoloïde sont présents tous deux dans les filtrats de culture des vibrions cholériques.

On sait que parmi les divers gangliosides, le ganglioside G_{M1} et certains de ses dérivés sont doués d'une affinité de type biochimique forte et spécifique pour le choléragène et le choléragénoloïde. Cette affinité est également observée avec certains dérivés du ganglioside G_{M1} . C'est en particulier le cas du lysoganglioside G_{M1} . Le lysoganglioside G_{M1} est obtenu par hydrolyse alcaline du ganglioside G_{M1} , selon le procédé décrit par Holmgren, Månsson et Svennerholm, «Medical Biology» (1974), 52, 229-233. Cette hydrolyse alcaline a pour but de transformer les deux fonctions N-acétyle et la fonction N-acyl du ganglioside G_{M1} en fonction amine NH_2 .

D'autres dérivés de gangliosides ont également une affinité pour la toxine cholérique.

Dans le présent exposé, on appellera par convention dérivé du ganglioside G_{M1} tout dérivé de ganglioside qui a une affinité pour la toxine cholérique et, notamment, les produits résultant d'une hydrolyse partielle ou totale des groupements N-acyl ou N-acétyle en groupements $-NH_2$, du ganglioside G_{M1} , mais aussi les mono- ou asialogangliosides résultant du traitement acide des gangliosides ou de leurs dérivés (notamment de leurs dérivés résultant de l'hydrolyse totale ou partielle des groupements N-acyl ou N-acétyle).

Les dimensions des particules du matériau de l'invention peuvent varier de 0,1 à 1000 μ .

L'invention a également pour objet le procédé de préparation du matériau particulaire défini ci-dessus. Ce procédé consiste, dans un premier stade, à fixer le ganglioside G_{M1} et/ou ses dérivés sur des

particules-supports. Cette fixation peut être réalisée soit par l'établissement d'une liaison chimique, soit en mettant à profit un phénomène d'affinité quelconque, par exemple un phénomène d'adsorption.

Le deuxième stade du procédé de l'invention consiste à fixer la toxine cholérique sur les particules revêtues de ganglioside G_{M1} ou de l'un de ses dérivés.

D'une façon générale, lorsque des particules recouvertes de ganglioside G_{M1} ou de lysoganglioside G_{M1} ont été préparées comme décrit ci-dessus, il est alors très facile et très rapide de préparer le matériau particulaire recouvert de toxine cholérique. En effet, une simple incubation avec le filtrat de culture, suivie d'une centrifugation suffisent à obtenir une purification et une concentration de la toxine sur les particules. Le surnageant peut ainsi être complètement débarrassé en une seule étape de la toxine, alors que généralement toutes les autres macromolécules inutiles y demeurent. En effet, la toxine se concentre d'elle-même sur des particules grâce à l'affinité très forte du ganglioside ou lysoganglioside G_{M1} particulaire pour le cholérageène et le cholérageñoïde.

Pour la fixation de la couche de toxine cholérique (deuxième stade du procédé), on laisse en contact les particules revêtues de ganglioside G_{M1} et/ou de l'un de ses dérivés pendant un temps suffisant pour obtenir, selon ce qui est souhaité, une saturation ou seulement un recouvrement partiel des sites réactifs (ganglioside G_{M1} ou ses dérivés) par la toxine. Ce temps varie généralement de 1 à 60 min, à température comprise entre 0 et 60°C.

Le matériau particulaire objet de l'invention est notamment constitué par des hématies sur lesquelles sont fixées une première couche constituée par du ganglioside G_{M1} , ou l'un de ses dérivés, et une deuxième couche constituée par du cholérageène, du cholérageñoïde ou leurs mélanges.

Les hématies sont préalablement traitées avec un dérivé carbonyle avant d'être revêtues par les deux couches.

Le dérivé carbonyle est de préférence le formol ou le glutaraldéhyde.

L'invention a également pour objet le procédé de préparation de ce matériau particulaire constitué par des hématies ainsi revêtues.

Ce procédé consiste, dans un premier stade, à faire réagir une suspension de globules rouges dans de l'eau physiologique avec un dérivé carbonyle, par exemple avec une solution dans l'eau physiologique dudit dérivé carbonyle, puis à mettre en contact le produit obtenu, avec une solution contenant du cholérageène, du cholérageñoïde ou leurs mélanges.

On rappelle que l'on désigne par eau physiologique une solution aqueuse de pH sensiblement neutre contenant 9 g/l environ de chlorure de sodium.

De préférence, on laisse en contact les hématies avec le dérivé carbonyle pendant une période de 15 min à 15 h à température pouvant varier de 0 à 60°C.

Les hématies ainsi traitées sont ensuite lavées à l'eau distillée puis amenées en solution dans l'eau physiologique.

En général, la quantité de dérivé carbonyle peut varier de 0,01 à 20 g par 100 ml de suspension d'hématies.

Pour fixer le ganglioside G_{M1} , on ajoute, à un pH supérieur ou égal à 8, une solution de ganglioside à une suspension d'hématies ainsi traitées.

De préférence, pour fixer le ganglioside G_{M1} , on opère à un pH voisin de 13.

La température d'incubation peut être comprise entre 0 et 60°C; elle est de préférence de 45°C environ. Le temps d'incubation est généralement au moins égal à 1 h et est de préférence égal à 15 h environ.

La suspension est ensuite centrifugée et le culot de centrifugation est lavé et mis en suspension dans l'eau physiologique.

Pour fixer le lysoganglioside G_{M1} sur les hématies, on opère de préférence de la façon suivante: à la suspension de globules rouges ayant subi le traitement avec le dérivé carbonyle, on ajoute une solution de lysoganglioside G_{M1} ayant un pH supérieur à 5 et de

préférence voisin de 7. De préférence, on laisse incubé à température pouvant varier de 0 à 60°C pendant un temps pouvant varier de 30 min à 3 h environ.

On soumet ensuite la suspension à une centrifugation et on recueille le culot de centrifugation que l'on lave et que l'on met en suspension dans l'eau physiologique.

Il a été observé qu'il est possible de fixer directement du lysoganglioside G_{M1} sur des hématies fraîches. Toutefois, on constate des phénomènes fréquents d'hémolyse surtout pour de fortes doses de lysogangliosides. Pour cette raison, il est préférable d'améliorer le réactif, comme décrit ci-dessus, en prétraitant les globules rouges par le dérivé carbonyle de manière à les rendre insensibles à toute influence hémolytique.

Il a été vérifié que les fonctions aldéhyde présentes sur les globules rouges qui ont été traitées par le glutaraldéhyde n'interviennent pas dans la réaction de fixation du ganglioside. En effet, on a découvert de façon surprenante que si on effectue une neutralisation chimique préalable de ces fonctions aldéhyde par addition d'une solution de glycolle à 20 g/l à pH compris entre 7 et 11, ce traitement ne gêne en rien la fixation ultérieure du ganglioside à pH alcalin.

Le matériau particulaire de la présente invention peut être préparé avec des hématies d'origine quelconque, par exemple des hématies humaines, des hématies de mouton, de singe, de lapin, de chien, de chèvre, de vache, de cheval, de poule, de pigeon, d'oise, etc.

Après avoir ainsi obtenu des hématies recouvertes d'une première couche de ganglioside G_{M1} ou de lysoganglioside G_{M1} , on met en contact lesdites hématies ainsi revêtues avec une solution contenant la toxine cholérique. En raison de l'affinité spécifique du ganglioside G_{M1} pour la toxine cholérique, la solution de toxine cholérique peut être une solution impure, par exemple un filtrat de culture brut de vibrions cholériques. On obtient ainsi la fixation sur la première couche (ganglioside) d'une deuxième couche (toxine cholérique).

Pour la fixation de la deuxième couche, qui constitue le deuxième stade du procédé, on laisse en contact les hématies revêtues de la première couche avec la solution de toxine pendant un temps variant de 1 à 60 min, à température variant de 0 à 60°C et, de préférence, de 20 à 45°C.

On sépare alors les particules par des procédés usuels, par exemple par centrifugation, on les lave afin d'éliminer les impuretés éventuellement présentes et on les met en suspension dans l'eau physiologique ou encore les soumet à une lyophilisation.

Le matériau particulaire de l'invention peut également être constitué à l'aide de bactéries comme particules-supports.

La technique de fixation du lysoganglioside G_{M1} ou de ses dérivés sur les germes bactériens est analogue à celle décrite ci-dessus pour la fixation sur les hématies.

Avant de fixer le ganglioside G_{M1} ou ses dérivés, on inactive les vibrions par traitement avec un dérivé carbonyle (formol, glutaraldéhyde, etc.) dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus pour les hématies.

On décrit ci-après dans la partie expérimentale la technique de fixation du ganglioside G_{M1} et lysoganglioside G_{M1} sur de telles particules bactériennes, en prenant l'exemple du vibron cholérique.

Le matériau particulaire de l'invention peut également être obtenu en utilisant comme support des particules de polymères organiques tels que les latex naturels ou synthétiques.

D'une façon générale, on peut utiliser des particules de polymères organiques susceptibles d'être maintenus en suspension homogène stable dans l'eau éventuellement grâce à la présence de détergent, de préférence de détergent anionique. On peut utiliser par exemple des polymères à base de monomères vinyliques tels que le styrène, le butadiène, le divinylbenzène, etc., pouvant contenir, en outre, d'autres fonctions chimiques telles que des fonctions alcool, amine, époxyde, acide carboxylique, acide sulfonique et esters correspondants.

On a constaté que la fixation du ganglioside G_{M1} sur les particules de latex obéissait aux mêmes lois que la fixation sur les hématies. En particulier, il a été observé qu'il était nécessaire

d'opérer à un pH alcalin pour coupler le ganglioside G_{M1} , mais que ce pH alcalin n'est pas nécessaire pour coupler le lysoganglioside G_{M1} . La fixation de la toxine est effectuée de façon analogue à celle décrite précédemment.

Pour les latex, le prétraitement avec un dérivé carbonyle devient généralement inutile. Toutefois, pour les latex porteurs de fonctions NH_2 , un tel prétraitement permet une activation chimique du support.

D'une façon générale, la fixation du ganglioside ou de ses dérivés sur les particules est vraisemblablement due à un phénomène d'incorporation de la partie hydrophobe du ganglioside ou de ses dérivés dans les sites hydrophobes des particules-soutiens. Ce phénomène, suffisant en soi, peut éventuellement être complété par une réaction chimique de couplage avec les fonctions réactives éventuellement présentes à la surface des particules.

Le matériau particulaire de l'invention peut aussi être constitué à l'aide de particules de charbon actif.

Pour des particules de carbone colloïdal, analogues à celles contenues dans l'encre de Chine, les mêmes techniques que pour le latex peuvent s'appliquer.

Pour des particules plus grosses de charbon actif, de granulométrie comprise entre 1 et 10 μ , la technique de fixation est encore plus simple compte tenu du pouvoir adsorbant considérable de ces particules. Même le ganglioside G_{M1} est cette fois adsorbé aussi bien à un pH neutre qu'à un pH alcalin. La fixation de la toxine est effectuée de façon analogue à celle décrite précédemment.

Le matériau particulaire de l'invention peut être constitué à l'aide de particules de polysaccharides. Par particules de polysaccharides, il faut entendre des particules visibles ou même des macromolécules solubles et donc invisibles. L'expression polysaccharide englobe ici les polysaccharides modifiés. Ces polysaccharides sont notamment du dextran, des celluloses, de l'amidon, de l'agarose, etc., ou encore des polysaccharides modifiés, notamment des dialkylaminoalkyl- ou di(hydroxyalkyl)aminoalkylpolysaccharides tels que, par exemple, le diéthylaminoéthylidextran, la diéthylaminoéthylcellulose, etc.

Les polysaccharides peuvent être également utilisés, non pas sous forme de particules, mais sous forme de revêtement sur des particules minérales, notamment des oxydes minéraux tels que ceux mentionnés ci-dessus.

Les particules minérales poreuses revêtues de polysaccharides, ou de polysaccharides modifiés, peuvent être notamment celles décrites dans la demande de brevet suisse N° 9575/76 ou celles décrites dans la demande de brevet français déposée au nom de la titulaire le même jour que la présente demande, et intitulée: «nouveau matériau capable de fixer de façon réversible des macromolécules biologiques, sa préparation et son application».

Les particules minérales revêtues de polysaccharides, conformément à la demande de brevet suisse N° 9575/76 sont constituées d'un support minéral poreux, tel qu'un oxyde minéral poreux, revêtu directement sur sa surface par un polymère polysaccharidique aminé.

Le support minéral poreux peut être de la silice, de l'alumine, de la magnésie, un oxyde de titane, ou leurs dérivés synthétiques ou naturels tels que verres, borosilicates, silicates, kaolin, etc.

Le polymère polysaccharidique aminé est fixé sur le support minéral poreux par encollage.

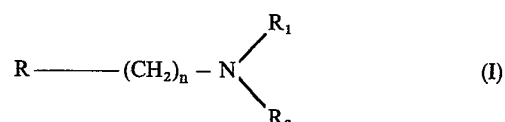
La surface interne du support minéral poreux est de préférence inférieure ou égale à 100 m^2/g et si possible comprise entre 5 et 80 m^2/g . Le diamètre poreux moyen est de préférence supérieur ou égal à 25 nm et si possible compris entre 50 et 1000 nm. Pour des surfaces plus grandes ou des diamètres poreux faibles la surface interne du support devient inaccessible au polymère polysaccharidique. Selon un mode préféré de l'invention, le support poreux minéral est de la silice ou de l'alumine et de préférence un support de silice poreuse à caractère anionique obtenue par exemple selon les procédés décrits dans les brevets français N°s 1473239, 1473240, 1475929, 1482867. On utilise par exemple des silices poreuses commercialisées par Rhône-Poulenc Chimie Fine sous les

dénominations de Spherosils XOB 030, XOB 015, et XOB 005, ces silices ayant des surfaces respectives de 50, 25 et 10 m^2/g .

Le polymère polysaccharidique aminé qui sert à imprégner et à recouvrir la surface interne du support poreux minéral doit avoir un caractère cationique prononcé et avoir de bonnes propriétés d'hydrophilie. Il doit avoir un poids moléculaire au moins égal à 10⁴ daltons et, si possible être compris entre 10⁵ et 10⁶. Sa formule peut être quelconque et il peut, en particulier, être un dérivé aminé du dextran, de l'amidon, de la cellulose, de l'agarose ou d'un polymère naturel ou synthétique de tous les oses connus.

Les fonctions amines du polymère polysaccharidique peuvent être primaires, secondaires ou tertiaires ou éventuellement quaternaires.

Le polymère polysaccharidique aminé peut notamment correspondre à la formule I suivante:

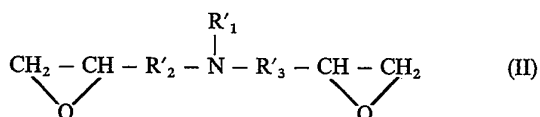


dans laquelle:

R représente un reste de polysaccharide tel que, par exemple, un reste de dextran, d'amidon, de cellulose ou d'agarose, n est un nombre entier de 1 à 10 et de préférence de 2 à 5, R_1 et R_2 identiques ou différents représentent un radical alkyle ou hydroxyalkyle inférieur, par exemple les radicaux suivants: $-CH_3$, $-CH_2-CH_3$, $-CH_2OH$, $-CH_2-CH_2OH$ ou $-CH_2-CHOH-CH_3$, ces polymères pouvant être quaternarisés à l'aide d'un agent quaternarisant classique tel que les halogénures d'alkyle ou d'hydroxyalkyle, le sulfate de diméthyle, etc.

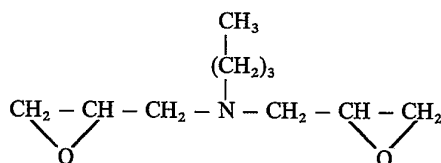
Parmi les polymères de ce type, on peut en particulier citer les composés connus sous les dénominations DEAE-Dextran (diéthylaminoéthylidextran) de poids moléculaire 500 000 et QAE-Dextran (diéthylaminoéthylidextran quaternisé), vendus par la firme Pharmacia, et le composé connu sous la dénomination DEAE-amidon (diéthylaminoéthylamidon) ainsi que les amidons cationiques tels que ceux vendus sous la dénomination commerciale CATO par la société Roquette National.

Le polymère polysaccharidique aminé peut aussi être réticulé à l'aide d'un agent réticulant tel que le 1-4-butanedioldiglycidyléther ou l'épichlorhydrine, l'épibromhydrine, un diépoxyde de formule II:



dans laquelle:

R'_1 est un alkyle de 1 à 20 atomes de carbone, de préférence un alkyle inférieur de 1 à 4 atomes de carbone, R'_2 et R'_3 représentent une chaîne hydrocarbonée de 1 à 10 atomes de carbone et de préférence un radical alkylène inférieur, par exemple le diépoxyde de formule:



Le procédé de préparation de ces particules revêtues de polysaccharide aminé peut être réalisé selon deux méthodes différentes à savoir l'imprégnation en colonne et l'imprégnation au four. Ces deux méthodes sont brièvement rappelées ci-après.

Selon la première méthode, on introduit l'oxyde minéral poreux dans une colonne de chromatographie en versant directement la poudre sèche et homogène. On introduit ensuite le polymère polysaccharidique aminé en solution. L'excès de polymère polysaccharidique aminé est alors éliminé par élution à l'aide d'un tampon.

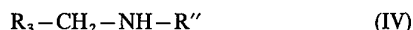
Selon la deuxième méthode dite d'imprégnation au four, l'oxyde minéral poreux, après avoir été pesé, est imprégné à froid ou à chaud à l'aide d'une solution aqueuse de polymère polysaccharidique aminé. On sèche ensuite à l'étuve entre 50 et 120° C jusqu'à poids constant.

Il est possible, après imprégnation selon l'une des méthodes décrites ci-dessus, et après avoir séché à l'étuve entre environ 50 et 80° C pour obtenir une poudre homogène, de traiter le produit obtenu à l'aide d'une solution d'un agent réticulant dans un solvant volatil tel que l'éther éthylique, par exemple.

Comme agent réticulant, on peut utiliser l'un quelconque de ceux précédemment mentionnés.

Après évaporation du solvant, on porte à une température comprise entre 40 et 120° C de préférence pendant environ 15 h.

Les particules minérales poreuses revêtues de polysaccharides modifiés ou non, selon la demande de brevet français déposée le même jour que la présente demande, mentionnée ci-dessus, sont constituées par un support minéral poreux revêtu par un polymère polysaccharidique, ou par un polymère polysaccharidique modifié, par exemple un polysaccharide aminé de formule I, ledit revêtement polysaccharidique étant si nécessaire stabilisé par réticulation, et sur ledit revêtement polysaccharidique, ou polysaccharidique modifié, se trouve greffé du lysoganglioside G_{M1} ou tout autre dérivé partiellement ou totalement hydrolysé du ganglioside G_{M1} , tel que défini ci-dessus, de formule schématique $R'' - NH_2$, R'' étant le reste de la molécule de dérivé du ganglioside G_{M1} ou de lysoganglioside G_{M1} , la liaison de greffage de ladite molécule répondant à la formule schématique IV :



R'' étant défini comme précédemment et $R_3 - CH_2 -$ représentant le reste dudit polymère polysaccharidique ou polysaccharidique modifié lorsque celui-ci a été soumis à réaction de coupure oxydante suivie d'une réduction.

Le support minéral poreux est constitué notamment par un oxyde métallique tel que la silice, l'alumine, la magnésie ou un oxyde de titane, ou par des dérivés synthétiques ou naturels de ces oxydes tels que les verres, les silicates, les borosilicates, le kaolin, etc. ; le polymère polysaccharidique est notamment la cellulose ; le polymère polysaccharidique modifié est notamment le diéthylaminoéthyl-dextran, le diéthylaminoéthylamidon, ou la diéthylaminoéthyl-cellulose ; le revêtement de polymère polysaccharidique modifié ou non est, si nécessaire, stabilisé par réticulation, l'agent réticulant étant, par exemple, un composé dicarboxylé, une halohydrine ou un diépoxyde, notamment le 1,4-butanedioldiglycidyléther, l'épichlorhydrine, l'épibromhydrine, ou un époxyde de formule II, telle que définie ci-dessus.

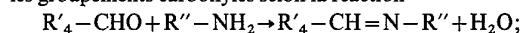
Le procédé de préparation des matériaux selon cette demande de brevet français déposée le même jour que la présente demande est caractérisé par le fait que l'on effectue un revêtement du support minéral poreux par le polymère polysaccharidique ou par le polymère polysaccharidique modifié, caractérisé par le fait que, si désiré, on transforme le revêtement polysaccharidique en revêtement polysaccharidique modifié, que l'on effectue si nécessaire une réticulation pour stabiliser le revêtement, que l'on soumet ledit revêtement polysaccharidique ou polysaccharidique modifié à une réaction de coupure oxydante selon les méthodes connues, que l'on fait réagir le produit d'oxydation ainsi obtenu avec le lysoganglioside G_{M1} ou tout autre dérivé du ganglioside G_{M1} tel que défini ci-dessus, de formule schématique $R'' - NH_2$, puis que l'on soumet le dérivé iminé obtenu à l'action d'un agent réducteur capable de réduire la liaison imine en liaison amine.

Le procédé décrit ci-dessus consiste donc, notamment, à fixer le lysoganglioside G_{M1} , ou tout autre dérivé du G_{M1} tel que défini précédemment, sur le revêtement polysaccharidique ou polysaccharidique modifié par la suite de réactions suivantes :

a) coupure oxydante des groupements alphasglycol pour donner des dérivés carbonylés que l'on peut schématiser par la formule

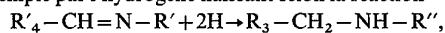
$R'_4 - CHO$, R'_4 étant le reste de la molécule polysaccharidique après la réaction de coupure oxydante ;

b) réaction du dérivé du ganglioside G_{M1} de formule $R''NH_2$ sur les groupements carbonylés selon la réaction



puis

c) réduction de la liaison imine en liaison amine stable, par exemple par l'hydrogène naissant selon la réaction



R_3 étant défini comme précédemment.

Ces diverses transformations chimiques peuvent être effectuées à température ambiante dans une colonne de chromatographie.

Pour la réaction de coupure oxydante, on peut utiliser par exemple l'acide periodique ou un de ses dérivés, tel qu'un periodate alcalin, ou bien le tétracétate de plomb.

Pour la réaction de réduction, on peut utiliser par exemple un hydrure tel que le borohydrure de sodium.

Pour effectuer le revêtement du support minéral poreux par le polymère polysaccharidique ou par le polymère polysaccharidique modifié, on peut procéder, par exemple, comme décrit dans la demande de brevet N° 76.23176, c'est-à-dire que l'on introduit dans une colonne de chromatographie le support minéral poreux sous forme de poudre, on fait passer un tampon de pH 3 à 12 jusqu'à équilibre, on introduit une solution dudit polymère dans le même tampon, puis on élue jusqu'à absence de polymère dans les éluats, ou bien on imprègne le support minéral poreux à l'aide d'une solution aqueuse dudit polymère à un pH compris entre 3 et 12, puis sèche à l'étuve entre 50 et 120° C jusqu'à poids constant.

Pour obtenir un revêtement de cellulose, il est avantageux d'opérer de la façon suivante : on imprègne le support minéral poreux à l'aide d'une solution d'un ester de cellulose, on sèche et soumet le support revêtu à l'action d'une solution aqueuse alcaline de façon à hydrolyser les groupements esters. On obtient de cette façon un support minéral poreux revêtu de la cellulose ainsi régénérée. Le revêtement de cellulose ainsi obtenu est très stable et tapisse parfaitement les pores du support minéral poreux. Il est inutile de stabiliser ce revêtement par réticulation.

Le polymère polysaccharidique ou polysaccharidique modifié qui sert à imprégner et à recouvrir la surface interne du support poreux minéral a un poids moléculaire au moins égal à 10^4 daltons et de préférence compris entre 10^5 et 10^6 daltons.

Pour fixer la toxine cholérique sur les particules constituées ou revêtues de lysoganglioside G_{M1} ou de ses dérivés, on opère comme décrit ci-dessus pour les hématies revêtues.

La présente invention a également pour objet l'application du matériau particulaire ainsi revêtu de toxine cholérique. Cette application consiste à administrer à des êtres vivants, possédant un système immunitaire, ledit matériau particulaire, dans le but notamment d'induire la formation d'anticorps.

On a constaté que tous les matériaux particuliers de l'invention sont capables, après injection à l'animal, d'induire une synthèse active d'anticorps antitoxine cholérique à des taux très élevés. Ces anticorps peuvent être isolés du sang selon les méthodes connues. L'obtention de tels anticorps est intéressante, car ils sont utilisables, notamment, comme réactifs en sérologie.

Pour les animaux susceptibles d'être affectés par le choléra et pour les humains, cette application constitue une vaccination.

L'invention a donc aussi pour objet l'application comme médicament du matériau particulaire décrit ci-dessus.

Ce médicament peut être administré, en tant que vaccin, par voie orale ; en outre, lorsque le matériau de l'invention est constitué à l'aide de particules-supports à base de germes bactériens et, notamment, de vibrions inactivés ou à base de polysaccharides, ou de polysaccharides modifiés solubles, il peut être administré par voie parentérale, notamment sous-cutanée.

On peut administrer, en une ou plusieurs fois, une dose du matériau particulaire capable d'induire une réponse immunitaire par formation d'anticorps.

De plus, lorsqu'ils sont administrés par voie orale à des humains porteurs de vibrions et risquant d'avoir ou ayant le choléra ou des diarrhées apparentées, les matériaux particuliers de l'invention permettent d'obtenir une stimulation de l'immunité, en particulier une stimulation de l'immunité des muqueuses digestives et intestinales.

En outre, lorsque les individus ont déjà été vaccinés antérieurement par voie parentérale ou orale contre le choléra à l'aide d'une préparation de toxines purifiées et inactivées et/ou à l'aide du vaccin de la présente invention, le matériau particulier de l'invention, administré par voie orale, permet d'obtenir, au niveau des muqueuses digestives, un effet de rappel immunitaire.

Il convient de noter que, lorsqu'on utilise notamment des particules à base de charbon ou de latex, il est possible de fixer, outre la toxine cholérique, d'autres macromolécules présentes dans les filtrats de culture des vibrions cholériques. De ce fait, l'immunité induite par ces particules, tout en étant moins spécifique que pour les autres particules, peut conférer certains avantages, dans le cas où l'immunité contre la seule toxine ne serait pas suffisante.

Il convient également de noter qu'il est possible de réaliser des particules recouvertes de ganglioside G_{M1} ou de lysoganglioside G_{M1} , mais non saturées par la toxine cholérique. L'administration par voie digestive, chez l'homme menacé de choléra, de telles particules non saturées en toxine cholérique permet d'obtenir une double protection, puisque, d'une part, elle permet d'induire l'immunité recherchée et que, d'autre part, elle protège l'individu temporairement contre toute sécrétion de toxine cholérique par les vibrions éventuellement présents dans l'intestin, car cette toxine cholérique vient se fixer préférentiellement sur les sites recouverts de ganglioside ou de lysoganglioside G_{M1} non encore saturés par la toxine cholérique.

Du fait de la présence de ganglioside G_{M1} , ou d'un dérivé de celui-ci, liant la toxine cholérique à la particule, la toxine se trouve en même temps et automatiquement inactivée. En effet, on peut vérifier que les matériaux particuliers ainsi obtenus sont dépourvus des caractères toxiques propres à la toxine cholérique.

Du fait de l'association de la toxine cholérique à une particule, la toxine se trouve plus aisément reconnue par les cellules immunitaires de l'organisme. La particule joue donc à la fois le rôle de principe vaccinant et de principe adjuvant.

L'invention a également pour objet, à titre de médicaments et notamment de vaccin, le matériau particulier décrit ci-dessus.

Le médicament de l'invention peut être présenté soit sous la forme d'une poudre (par exemple lyophilisée) à dissoudre ou à mettre en suspension dans l'eau ou dans l'eau physiologique (solution à 9 g/l environ de chlorure de sodium dans l'eau), soit sous la forme d'une solution en suspension à administrer directement.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter.

Exemple 1:

Fixation de toxine cholérique sur silice poreuse revêtue de DEAE-dextran réticulé au 1,4-butanedioldiglycidyléther, puis revêtue de ganglioside.

A partir de 1 kg de cervelles de veau, on prépare un extrait aqueux d'environ 7 l (selon un procédé décrit par L. Svennerholm: «Gangliosides, isolation Methods in carbohydrate chemistry», vol. 6, Edition R. L. Whister and J.N. Bemiller, Acad. Press, New York, 1972).

Cet extrait aqueux est passé directement sur une colonne de 50 g d'un support réalisé suivant l'exemple 3 de la demande de brevet français N° 76.23176, préalablement équilibrée en tampon tris-HCl 0,05M, pH 6,8. Le débit est de 200 ml/cm²/h. Les gangliosides, dont environ 40% de ganglioside G_{M1} , s'accrochent sur la colonne dans ces conditions. Un lavage préalable par les solutions suivantes et dans l'ordre indiqué:

tris-HCl 0,05M pH 6,8

NaOH 0,1N

H₂O

chloroforme/méthanol/eau en proportions volumétriques respectives suivantes (30-60-25)

permet d'éliminer des impuretés nombreuses. Ayant ainsi fixé le ganglioside sur le support particulière, on fixe ensuite la toxine cholérique de la façon suivante:

On incube le produit particulière obtenu au stade précédent avec une solution de toxine cholérique pendant quelques minutes à température ambiante. Après centrifugation, on constate que le surnageant n'a pas de caractère toxique. On lave ensuite le culot de centrifugation par une solution de chlorure de sodium à 9 g/l pour éliminer les protéines non fixées sur le lysoganglioside G_{M1} . On obtient finalement une suspension à 10% de particules. Cette suspension peut être lyophilisée.

Exemple 2:

Greffage du lysoganglioside G_{M1} sur support minéral poreux imprégné de diéthylaminoéthyl-dextran secondairement réticulé, puis fixation de toxine cholérique.

2.1 Le support à base de DEAE-dextran est préparé selon l'une des techniques citées dans la demande de brevet N° 76.23176.

10 g de Sphérosil XOB 030 sont additionnés de 30 ml de DEAE-dextran 7,5% à pH 11,5. L'ensemble est séché une nuit à 80°C, puis additionné de 30 ml d'une solution de butanedioldiglycidyléther à 1,5% dans l'éther éthylique. L'éther est évaporé sous un courant d'air, puis l'ensemble est mis 15 h à 80°C, pour obtenir la réticulation du DEAE-dextran.

2.2 La solution de gangliosides est préparée par chromatographie d'échange d'ions sur silice poreuse imprégnée de DEAE-dextran selon la méthode décrite à l'exemple précédent.

La solution brute de gangliosides ainsi obtenue contient environ 40% de ganglioside G_{M1} utile dans la présente application.

Les deux fonctions N-acétyl et la fonction N-acyl du ganglioside G_{M1} sont alors hydrolysées en fonctions aminées NH₂, par hydrolyse alcaline selon le procédé décrit antérieurement [Holmgren-Mansson-Svennerholm, «Medical Biology» (1974), 52, 229-233]. Le produit ainsi obtenu est appelé lysoganglioside, il possède trois fonctions NH₂ par molécule. Après lyophilisation, la poudre obtenue est dissoute dans un tampon carbonate 0,01M de pH 9 contenant 20 g/l de NaCl, à la concentration de 1 mg/ml. 1 ml de cette solution contenait environ 370 µg d'acide sialique par millilitre.

2.3 Oxydation périodique du support.

Les 10 g de Sphérosil XOB 030, imprégnés de DEAE-dextran secondairement réticulé, sont additionnés de 100 ml d'une solution aqueuse de periodate de sodium 0,02M (pH voisin de 4,5). Le temps d'oxydation est de 2 h, la température ambiante convient très bien pour cette opération.

Le support est ensuite lavé dans une solution de carbonate de sodium 0,01M, de pH 9, additionnée de 20 g/l de chlorure de sodium. La force ionique élevée de ce tampon est destinée à saturer les groupements cationiques du DEAE-dextran réticulé et oxydé par des ions Cl⁻ et à les empêcher de fixer ultérieurement le lysoganglioside par des forces électrostatiques risquant de gêner la réaction des groupements aminés sur les fonctions aldéhyde du support.

A ce stade, il est facile de mettre en évidence les fonctions aldéhyde du support oxydé. En présence de réactif de Schiff, une coloration rose violacée intense se développe.

2.4 Greffage du lysoganglioside. Le support précédent est lavé puis additionné de 50 ml de la solution de lysoganglioside G_{M1} . Après un temps de contact de 2 h, le surnageant de contact est décanté. Par un dosage d'acide sialique, il est facile de montrer que la quasi-totalité du lysoganglioside a été couplée (95 à 100%).

Le support est rincé en tampon carbonate pH 9. A ce stade, il est facile de montrer également que la coloration du support avec le réactif de Schiff est beaucoup plus faible que dans l'étape précédente, indiquant une bonne fixation du lysoganglioside sur les fonctions aldéhyde du support oxydé.

2.5 Réduction par le borohydrure de sodium. 50 ml d'une solution 0,2M de NaBH_4 dans l'eau sont additionnés au support précédent. Après un temps de contact de 2 h à température ambiante, le support est rincé à l'eau puis monté en colonne.

Après équilibrage dans le tampon de chromatographie choisi (tampon phosphate 0,01M de pH 7,2 contenant 20 g/l de NaCl), la colonne d'affinité biospécifique est prête à l'emploi.

A ce stade, aucune trace de fonction aldéhyde n'est plus décelable par coloration avec le réactif de Schiff. Les fonctions aldéhyde n'ayant pas réagi avec le lysoganglioside sont elles-mêmes transformées en fonctions alcool primaire.

2.6 Fixation de la toxine cholérique. Pour fixer la toxine, on opère de façon analogue à celle décrite à l'exemple 1.

Exemple 3 :

Greffage du lysoganglioside G_{M1} sur support minéral poreux imprégné de cellulose, puis fixation de toxine cholérique.

3.1 Imprégnation en cellulose. 10 g de Sphérosil XOC 005 (ou de tout autre support minéral poreux) sont additionnés de 30 ml d'une solution acétonique d'acétate de cellulose à 3% (le propionate de cellulose ou d'autres esters solubles en milieu organique solvant et hydrolysables peuvent convenir aussi bien, pourvu qu'ils puissent redonner la cellulose originale par hydrolyse alcaline).

L'ensemble est séché sous un courant d'air chaud. La poudre peut alors être tamisée, si nécessaire, et montée en colonne.

Un lavage par 10 l de solution aqueuse de NaOH 0,1N est alors pratiqué en continu à un débit de 500 ml/h pendant toute une nuit. Après cette hydrolyse alcaline, la colonne peut être lavée à l'acétone ou à l'eau quel qu'en soit le pH, la cellulose ainsi régénérée n'est plus soluble et reste parfaitement à l'intérieur des pores du support minéral poreux qu'elle tapisse d'autant mieux que le polymère initial a pu accéder aisément à la totalité de la surface interne. L'emploi d'esters de cellulose de poids moléculaire aussi faible que possible est conseillé pour cette raison.

3.2 Préparation de la solution de lysoganglioside G_{M1} à fonctions aminées. Mêmes conditions que dans le paragraphe 2.2 de l'exemple précédent.

3.3 Oxydation periodique du support. Mêmes conditions que dans le paragraphe 2.3.

3.4 Greffage du lysoganglioside. Mêmes conditions que dans le paragraphe 2.4.

3.5 Réduction par le borohydrure de sodium NaBH_4 . Mêmes conditions que dans le paragraphe 2.5.

3.6 Fixation de la toxine cholérique. Mêmes conditions que dans l'exemple 1.

Exemple 4 :

Fixation du lysoganglioside G_{M1} sur des hématies préalablement traitées avec un dérivé carbonyle, puis fixation de la toxine cholérique.

4.1 Des hématies de mouton sont lavées 4 fois dans de l'eau physiologique (pH 7,2-NaCl 9 g/l) de façon à obtenir un surnageant de lavage final parfaitement clair.

Les hématies sont amenées à une concentration de 8% en eau physiologique et additionnées d'un volume égal d'une solution de formaldéhyde à 3% en eau physiologique.

Après une incubation de 18 h à 37°C, les hématies formolées sont lavées quatre fois en eau distillée, puis amenées à 10% en eau physiologique.

4.2 Traitement des hématies par le glutaraldéhyde. Des hématies de mouton sont lavées quatre fois dans de l'eau physiologique, puis amenées à une concentration de 10% et, enfin, additionnées d'un volume 20 fois plus faible de glutaraldéhyde à 5% en eau physiologique pH 7,2.

Après un temps d'incubation de 2 h à température ambiante, les hématies glutaraldéhydées sont lavées en eau distillée, puis amenées à 10% en eau physiologique.

4.3 Fixation du ganglioside G_{M1} sur les hématies préalablement

traitées avec un dérivé carbonyle. Les globules rouges formolés ou glutaraldéhydés obtenus précédemment sont lavés par une solution de NaOH 0,1N ou par toute autre solution basique de pH alcalin inférieur ou égal à 8 et de préférence égal à 13.

5 Un volume de cette suspension à 10% est incubé avec un volume d'une solution de ganglioside dans la soude 0,1N, contenant 100 µg d'acide sialique par millilitre, c'est-à-dire environ 0,5 mg de ganglioside G_{M1} /ml.

La température d'incubation peut être comprise entre 0 et 60°C, mais est de préférence ajustée à 45°C.

10 Le temps de contact est maintenu pendant plus d'1 h de préférence pendant 15 h.

La suspension est alors centrifugée, le dosage d'acide sialique dans le surnageant permet d'estimer le pourcentage de fixation du ganglioside sur les globules rouges à environ 50%.

Après trois lavages à l'eau physiologique, la suspension finale est reprise et conservée à une concentration de 10%.

4.4 Fixation du lysoganglioside G_{M1} sur des hématies préalablement traitées avec un dérivé carbonyle.

20 Une suspension de globules rouges formolés ou glutaraldéhydés à 10%, préparée comme précédemment est additionnée de 2 mg de poudre lyophilisée de lysoganglioside G_{M1} . Une quantité de 0,1 à 10 mg donne également des résultats satisfaisants. Le pH d'incubation est de 7,2 mais peut évidemment aussi être alcalin comme dans la méthode précédente.

25 Le temps d'incubation est de 30 min à 3 h.

La température d'incubation peut varier de 0 à 60°C, mais a été choisie égale à 37°C.

Après centrifugation, le surnageant de couplage ne contient plus que 1 à 5% du lysoganglioside initial, ce qui montre l'efficacité de cette méthode de fixation.

Enfin après trois lavages dans de l'eau physiologique, la suspension finale est reprise et conservée à une concentration de 10%.

35 Le lysoganglioside G_{M1} utilisé comme produit de départ est préparé par hydrolyse alcaline selon le procédé décrit par Holmgren, Mansson et Svennerholm, « Medical Biology » (1974), 52, 229, 233.

4.5 Fixation de la toxine cholérique. Pour fixer la toxine, on opère de façon analogue à celle décrite à l'exemple 1.

Exemple 5 :

40 Couplage du ganglioside G_{M1} ou du lysoganglioside G_{M1} sur particules de latex, puis fixation de la toxine cholérique.

5.1 Trois volumes d'une suspension de latex à 10% sont additionnés de un volume d'une solution de ganglioside contenant de 1 à 45 3 mg G_{M1} par ml.

Le latex utilisé est celui commercialisé par Rhône-Poulenc sous la marque Estapor.

Le pH de la suspension est ajusté à 13 par addition d'une quantité suffisante de soude normale.

50 La température d'incubation est de 45°C, mais peut varier de 5 à 60°C.

Le temps de contact est de 15 h environ.

La suspension est alors ultracentrifugée à 30 000 tr/min pendant 1 h.

55 Le dosage d'acide sialique et le dosage du ganglioside dans le surnageant permet de montrer que la totalité de G_{M1} a été fixée sur les particules de latex.

Après trois lavages dans de l'eau physiologique additionnée de Tween 80 à 0,1%, il est possible de vérifier que toute l'activité biologique du G_{M1} a disparu du surnageant, qu'elle n'est pas apparue dans les surnageants des lavages et qu'elle se trouve conservée intégralement dans le culot repris à une concentration finale de 1%.

5.2 Couplage du lysoganglioside G_{M1} . La même technique que 65 pour le ganglioside G_{M1} s'applique sauf que le pH n'est pas nécessairement alcalin. Un pH neutre peut aussi bien convenir.

5.3 Fixation de la toxine cholérique. On opère comme dans l'exemple 1. Toutefois, pour séparer le matériau particulaire finale-

ment obtenu, il faut remplacer l'étape de centrifugation par une étape d'ultracentrifugation dans le cas présent.

Exemple 6:

Couplage du ganglioside G_{M1} sur des particules de charbon actif, puis fixation de toxine cholérique.

6.1 Un volume de suspension de charbon particulaire à 30% est mélangé avec un volume de solution de ganglioside G_{M1} à une concentration variant de 1 à 3 mg/ml. Après centrifugation, lavages et reprise dans un tampon physiologique à une concentration de 1%, la suspension est prête à l'emploi pour la fixation de la toxine cholérique.

En opérant de la même façon, on peut fixer du lysoganglioside G_{M1} à la place du ganglioside G_{M1} .

6.2 Fixation de la toxine cholérique. On opère de façon analogue à celle décrite à l'exemple 1. Si nécessaire, on remplace la centrifugation par une ultracentrifugation à 30 000 tr/min pendant 1 h environ (cas où les particules sont colloïdales). On lave ensuite le culot de centrifugation à l'eau physiologique et obtient une suspension concentrée permettant de préparer par dilution des doses de vaccin anticholérique.

Exemple 7:

Immunisation de lapins.

La suspension à 10% de particules obtenue à l'exemple 4 ci-dessus est injectée à des lapins, à raison de 1 ml chaque semaine, par voie sous-cutanée, pendant quatre semaines. Chacun des lapins, sans exception, s'immunise et synthétise des anticorps antiglobules rouges facilement éliminés par mélange de l'antisérum avec un volume d'une suspension à 50% de globules rouges frais.

Après ce traitement, on constate: a) que les sérums des lapins ainsi immunisés donnent une seule ligne de précipitation avec un filtrat de culture riche en toxine, en immunodiffusion double, b) que

cette ligne de précipitation forme une réaction d'identité complète avec la ligne obtenue entre une préparation étalon de toxine cholérique purifiée et les mêmes antisérums de lapins, et c) que cette ligne de précipitation n'existe pas entre les sérums de lapins et le même filtrat de culture débarrassé d'activité toxique.

Exemple 8:

Greffage du ganglioside G_{M1} ou du lysoganglioside G_{M1} sur des vibrions cholériques.

10 Une suspension de vibrions cholériques (du type Inaba ou de type Ogawa ou du mélange de ces deux types) est ajustée à une concentration de 10^9 germes/ml. Cette suspension est traitée par le formol ou par le glutaraldéhyde indifféremment dans des conditions rigoureusement identiques à celles décrites ci-dessus pour la suspension d'hématies.

15 La technique de couplage du ganglioside et du lysoganglioside G_{M1} est la même que celle décrite ci-dessus pour la suspension d'hématies. De même, la technique du couplage de la deuxième couche (toxine) est la même que celle décrite ci-dessus pour les

20 hématis.

Le produit obtenu peut être lyophilisé si désiré.

Il constitue un vaccin qui peut être administré par voie sous-cutanée.

Exemple 9:

25 Fixation de toxine cholérique sur particules de charbon revêtues de ganglioside G_{M1} , sans saturation du ganglioside par la toxine.

On opère comme décrit à l'exemple 6, en utilisant toutefois une quantité de toxine cholérique inférieure, par exemple de 50%, à celle

30 qui est nécessaire pour saturer les sites réactifs du ganglioside G_{M1} . On obtient une suspension qui, administrée par voie orale, permet de protéger contre la maladie des personnes exposées à la contagion cholérique.