

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

**N° 80 25753**

(54) Procédé de préparation d'un agent antitumoral comprenant un composant cellulaire de *Streptococcus pyogenes*.

(51) Classification internationale (Int. Cl. <sup>3</sup>). A 61 K 35/74.

(22) Date de dépôt..... 4 décembre 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : Japon, 4 décembre 1979, n° 157 643/79.

(41) Date de la mise à la disposition du  
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 25 du 19 juin 1981.

(71) Déposant : Société dite : KANEBO LTD., société de droit japonais, résidant au Japon.

(72) Invention de : Mikio Sotomura, Seiichi Iwamoto, Teruo Sawada, Shintaro Inoue, Akira Suzuki et Yoshiaki Ikeda.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Armengaud Jeune, Casanova, Akerman et Lepeudry,  
23, bd de Strasbourg, 75010 Paris.

La présente invention concerne un nouveau procédé de préparation d'un agent anti-tumoral comprenant un composant cellulaire de Streptococcus pyogenes (ci-après écrit St. pyogenes) qui est doué d'activité anti-tumorale, plus particulièrement un agent anti-tumoral très actif, ayant moins d'effets secondaires, et qui reste très stable.

On cultive depuis quelques années St. pyogenes et on utilise en thérapeutique des agents anti-tumoraux préparés avec des cellules de ce micro-organisme (appelées dans ce qui suit cellules de culture ou bactéries vivantes), mais les préparations de ce genre doivent avoir une forte activité anti-tumorale et en même temps ne pas contenir de bactéries vivantes, qui sont pathogènes.

Plusieurs propositions ont été avancées pour des procédés permettant de satisfaire ces demandes, dont le plus représentatif est un procédé consistant à maintenir les cellules de culture dans des solutions aqueuses de sels contenant de la pénicilline, entre 30 et 38°C, puis à lyophiliser la préparation contenant la pénicilline [Japanese Journal of Experimental Medicine, Vol. 36, p.161-174 (1966)]. Mais les préparations qui sont obtenues par ce procédé ont des inconvénients dus aux effets secondaires de la pénicilline, tels que chocs, éruptions cutanées, douleur au moment de l'injection etc..., et de plus il est encore difficile de dire qu'elles ont une action anti-tumorale satisfaisante.

A cet égard, des préparations de ce genre devraient de préférence ne pas contenir de pénicilline, mais néanmoins, comme on vient de le dire, des préparations contenant de la pénicilline sont encore employées, et ceci pour la raison que si l'on élimine la pénicilline après que les cellules de culture ont été traitées avec cet antibiotique, la préparation obtenue n'a plus qu'une activité anti-tumorale très réduite (voir l'exemple comparatif 2 du tableau 1 ci-après).

La présente demanderesse a étudié diverses voies en vue d'obtenir de meilleures préparations anti-tumorales, c'est-à-dire ayant une meilleure activité à cet égard et dépourvues des effets secondaires dus à la présence  
5 de bactéries vivantes, pénicilline etc..., et elle a ainsi trouvé un procédé permettant non seulement d'atteindre cet objectif, mais aussi, d'une manière surprenante, d'obtenir d'excellentes préparations qui restent très stables.

10 La présente invention est expliquée plus en détail ci-après.

Elle consiste à soumettre les cellules de culture à un traitement de pasteurisation (premier stade) et à un traitement à la pénicilline (second stade), puis à  
15 effectuer une première lyophilisation (troisième stade), ce qui donne une préparation intermédiaire que l'on soumet ensuite à un traitement d'élimination de la pénicilline (quatrième stade) puis à une seconde lyophilisation (cinquième stade) pour obtenir la préparation finale.

20 Les cellules de culture dont on part sont obtenues par culture de *St. pyogenes*, culture qui est effectuée par le procédé connu décrit dans la demande de brevet japonais n° 43-6690 avec le milieu sans sources de carbone fermentables, ou bien par le procédé de la présente  
25 demanderesse décrit dans la demande de brevet japonais n° 55-61792 (voir l'exemple expérimental décrit ci-après), dans lequel on ajoute des sources de carbone fermentables au milieu de culture ci-dessus et on cultive *St. pyogenes* en réglant le pH du milieu entre 5,6 et 7,5.

30 Des souches de *St. pyogenes* utilisables dans l'exécution de la présente invention peuvent être celles appartenant à *St. pyogenes* connu, telles que *St. pyogenes* ATCC N° 21060, *St. pyogenes* ATCC N° 21059 [voir le catalogue ATCC de souches I (1978)], *St. pyogenes* IID S-43,  
35 *St. pyogenes* IID T-3 [voir le catalogue JFCC de cultures (1979)] et autres, toutes ces souches étant facilement disponibles.

Les cellules qui se sont multipliées par culture sont recueillies par des méthodes habituelles, par exemple centrifugation et purification éventuellement dans un solvant approprié tel que l'eau, du soluté physiologique normal ou autres, et sur ces cellules on effectue les cinq opérations indiquées, de la manière suivante.

Pour le traitement de pasteurisation (premier stade) tout moyen peut être choisi du moment qu'il tue les bactéries vivantes sans altérer l'activité antitumorale, mais en ce qui concerne l'efficacité et la simplicité de cette opération, il est préférable de traiter les cellules de culture avec du peroxyde d'hydrogène ou un mono-alcool.

Si l'on choisit le peroxyde d'hydrogène, on met les cellules en suspension par exemple dans du soluté physiologique et on ajoute le peroxyde d'hydrogène aqueux à raison du vingtième au tiers, de préférence du quinzième au cinquième, du volume de la suspension, s'il s'agit de peroxyde d'hydrogène à 10 %, par exemple, on maintient à une température par exemple de -5 à 10°C, de préférence de 0 à 5°C, pendant 10 à 120 minutes, de préférence pendant 20 à 40 minutes, puis on recueille les cellules par centrifugation. La concentration du peroxyde d'hydrogène n'est pas limitée à 10 % mais la quantité de peroxyde doit rester dans cette gamme par rapport à la suspension de cellules. Si l'on utilise un mono-alcool, on met celui-ci en contact intime avec les cellules, par exemple en l'ajoutant aux cellules ou à une suspension de celles-ci dans du soluté physiologique par exemple..

Des alcools utilisables sont des mono-alcools, de préférence des alcools ou thio-alcools aliphatiques en  $C_1-C_{12}$ , dont des exemples sont les alcools méthylique, éthylique, n-propylique, iso-propylique, n-butylique, sec-butylique, tert-butylique, n-amylique, sec-amylique, tert-amylique, iso-amylique, n-hexylique, n-octylique et benzylique, le mercapto-éthanol etc..., tous ces alcools

pouvant être employés séparément ou en mélanges de plusieurs d'entre eux, mais l'alcool éthylique est particulièrement préférable.

Si l'on emploie des alcools facilement solubles dans l'eau, on met les cellules de culture en suspension dans une solution aqueuse de l'alcool et on mélange, mais si l'alcool est peu soluble dans l'eau, on l'ajoutera par exemple à une suspension des cellules dans du soluté physiologique et on mélangera bien les deux couches par agitation. La concentration de l'alcool varie avec les rapports entre le type d'alcool, la température et le temps de traitement, mais la quantité d'alcool sera de préférence, en poids, de 1 à 100 fois celle des cellules, et sa concentration d'environ 4 %, en poids par volume, ou plus, par rapport à l'ensemble de la solution de traitement.

Pour un traitement à l'alcool la température peut être de 50°C ou moins, de préférence de -5 à 45°C et mieux encore de 0 à 5°C, tandis que le temps de traitement n'est pas particulièrement limité et peut être en général de 10 à 60 minutes.

Le traitement avec un alcool permet non seulement de tuer les bactéries vivantes, mais aussi d'obtenir des préparations finales dont l'activité anti-tumorale est nettement renforcée (se reporter à cet égard en particulier aux exemples 2 à 5 du tableau 1 ci-après).

Pour le traitement à la pénicilline selon l'invention (second stade), on met les cellules qui viennent d'être soumises à la pasteurisation en suspension dans un milieu aqueux contenant de la pénicilline et on maintient entre 10 et 50°C pendant 10 à 60 minutes, de préférence à 35-37°C pendant 20 à 30 minutes, puis à 40-45°C pendant 20 à 30 minutes encore.

De l'eau suffit comme milieu aqueux mais on peut prendre aussi des solutions de sels, par exemple du soluté physiologique normal ou le milieu basal de Bernheimer qui comprend 675 mg de maltose, 6 ml d'une solution aqueuse

à 2 % de dihydrogéo-phosphate de potassium ajustée à pH 7 avec de l'hydroxyde de sodium, 12 ml de sulfate de magnésium heptahydraté aqueux à 2 % et 66 ml d'eau distillée, ce milieu étant désigné ci-après par l'abréviation

5 BBM.

Comme pénicilline employée dans le second stade on peut indiquer la pénicilline G, l'ampicilline, l'amoxicilline, la phénéthiicilline, la dicloxacilline, l'hétacilline, la méthicilline et leurs sels.

10 On dissout ces pénicillines dans le milieu aqueux et on les utilise au titre de 5 mg/ml ou plus, de préférence de 10 mg/ml ou plus et mieux encore de 15 à 50 mg/ml.

La pénicilline employée dans le seconde stade

15 n'est pas une cause d'effets secondaires, même dans une forte proportion, puisqu'elle est éliminée dans le quatrième stade décrit ci-après.

Dans la première lyophilisation (troisième stade selon l'invention), la suspension de cellules contenant de la pénicilline, qui provient du second stade, est lyophilisée telle quelle sous pression réduite, en général à une température de 20°C ou moins, de préférence de -10°C ou moins, par les méthodes courantes, ce qui donne une

20 préparation intermédiaire.

25 Cette préparation intermédiaire ne contient pas de bactéries vivantes et elle montre une très grande activité anti-tumorale, mais comme elle contient de la pénicilline elle a des effets secondaires dus à cet antibiotique, et de plus elle manque de stabilité (voir

30 l'exemple comparatif 1 du tableau 1 ci-après).

Dans le quatrième stade on élimine la pénicilline, sans altérer l'activité anti-tumorale, de la préparation intermédiaire résultant de la première lyophilisation du troisième stade.

35 Les moyens employés pour éliminer la pénicilline ne sont pas particulièrement limités du moment que l'activité anti-tumorale est conservée, mais une méthode

spécialement préférable consiste à mettre la préparation intermédiaire en suspension dans un milieu aqueux tel que de l'eau, du soluté physiologique, le milieu BBM ou autres, à une température de 30°C ou moins, de préférence de -5 à 5°C, puis on sépare les cellules par centrifugation, et le cas échéant en répétant cette opération deux fois ou plus, on peut obtenir des cellules qui ne contiennent plus de pénicilline.

Si, au contraire de la présente invention, les cellules de culture sont soumises successivement au traitement de pasteurisation (premier stade) et au traitement à la pénicilline (second stade) et qu'on en élimine ensuite la pénicilline puis qu'on les lyophilise, c'est-à-dire si les cellules sont lyophilisées en l'absence de pénicilline, l'activité anti-tumorale de la préparation ainsi obtenue s'en trouve nettement altérée (voir l'exemple comparatif 2 du tableau 1).

Pour terminer, on effectue la seconde lyophilisation (cinquième stade) en mettant les cellules qui ont été débarrassées de la pénicilline en suspension dans un milieu aqueux tel que de l'eau, du soluté physiologique, le milieu BBM ou autres, de préférence avec un stabilisant et/ou un véhicule, et on lyophilise la suspension dans les mêmes conditions que pour la première lyophilisation, par des méthodes usuelles, ce qui donne la préparation finale selon l'invention.

Des exemples du stabilisant sont des anti-oxydants minéraux comme le thiosulfate de sodium, le pyrosulfite de sodium, l'hydrogénosulfite de sodium etc..., des protéines inertes comme la gélatine, l'albumine et autres, des amino acides tels que la méthionine, l'arginine, la cystine et autres, des polysaccharides, tels que le dextranne, le sulfate de dextranne, l'amidon etc..., ainsi que l'hydrogénocarbonate de sodium et autres corps semblables, qui peuvent tous être employés séparément ou en diverses associations.

Des véhicules représentatifs sont des disaccharides comme le maltose et le lactose, mais on peut en

employer d'autres.

La préparation finale selon l'invention a une grande activité anti-tumorale et elle est nettement améliorée en ce qui concerne les effets secondaires du fait  
5 qu'elle ne contient ni bactéries vivantes ni pénicilline, et de plus son action anti-tumorale ne baisse pas, même après une longue période de conservation.

Comme il a été dit, le trait caractéristique de la présente invention est que l'on obtient d'excellentes  
10 préparations anti-tumorales en soumettant successivement les cellules de culture à un traitement de pasteurisation (premier stade), à un traitement à la pénicilline (second stade), à une première lyophilisation (troisième stade), à un traitement d'élimination de la pénicilline (quatrième  
15 stade) et enfin à une seconde lyophilisation (cinquième stade).

Contrairement à la présente invention, les produits que l'on obtient sans en avoir enlevé la pénicilline, comme dans l'exemple comparatif 1 ci-après,  
20 entraînent des effets secondaires dus à la présence de pénicilline, et de plus ces produits conservent mal leur stabilité. En outre, les préparations obtenues par lyophilisation en l'absence de pénicilline, comme dans l'exemple comparatif 2, se montrent inférieures sous les  
25 deux aspects de l'action anti-tumorale et de la conservation de leur stabilité.

Les préparations selon cette invention peuvent être employées en thérapeutique de la même manière que les préparations déjà connues. On peut par exemple mettre  
30 la préparation en suspension dans du soluté physiologique normal ou dans une solution aqueuse de glucose, et l'administrer en injections hypodermiques, intramusculaires ou intraveineuses à raison de 0,02 à 1,0 mg du composant cellulaire, pendant plusieurs jours successifs ou deux  
35 ou trois fois par semaine.

La présente invention sera maintenant illustrée par les exemples et les exemples comparatifs qui suivent.

Les cellules de culture et leurs suspensions dont on part dans les essais respectifs sont préparées de la manière indiquée dans l'exemple expérimental ci-après.

- 5 La toxicité aiguë ( $DL_{50}$ ) et l'activité anti-tumorale (in vitro et in vivo) de chacune des préparations du tableau 1 ont été déterminées de la manière indiquée ci-dessous.

EXEMPLE EXPERIMENTAL :

- 10 Exemple de préparation des cellules de culture :  
on inocule 150 ml d'une solution de culture de Streptococcus pyogenes, souche ATCC 21060, cultivée d'avance avec le bouillon nutritif (Kyokuto Seiyaku), dans un milieu de culture à pH 7,2-7,4, obtenu par dissolution de 60 g  
15 d'un bouillon de polypeptones de soja [Phytone<sup>®</sup> (BBL)] dans 2 litres d'eau distillée et stérilisation à la vapeur à 121°C pendant 20 minutes.

- On mélange ensuite une solution aqueuse de glucose pour que la teneur en glucose soit de 0,4 % du  
20 poids de l'ensemble de la solution de culture, et on cultive les cellules pendant 20 heures à 37°C en réglant le pH à 6,5 avec une solution de NaOH 5N, puis on refroidit la solution au moyen de glace et on rassemble les cellules  
25 obtenues en suspension dans 80 ml de soluté physiologique normal, 80 ml de cette suspension contiennent 1400 à 1600 mg de cellules, soit en moyenne 1500 mg (concentration moyenne des cellules 18,75 mg/ml).

Toxicité aiguë ( $DL_{50}$ ) :

- 30 On expérimente sur un groupe de 5 souris femelles de la souche ddy, âgées de 4 semaines.

- Les échantillons respectifs (préparations) sont placés dans du soluté physiologique pour préparer des suspensions cellulaires aux concentrations respec-  
35 tives, suspensions qui sont injectées par la voie intra-veineuse dans la queue des souris à la dose de 0,01 ml par gramme de poids corporel, et on calcule la  $DL_{50}$  par

la méthode de Weil d'après les résultats d'observations de 7 jours.

Activité anti-tumorale in vitro :

On transplante sur des rats par la voie intra-péritonéale des cellules du sarcome de Yoshida et 5 jours après on prélève leur ascite que l'on centrifuge pendant 7 minutes à 120 G environ pour recueillir les cellules du sarcome que l'on met en suspension dans un milieu de culture Eagle MEM additionné de sérum de cheval à 20 %, à la concentration de  $5 \times 10^4$  cellules/ml, ce qui donne la solution de cellules à étudier.

On dilue l'échantillon avec du soluté physiologique pour préparer des solutions d'essai à diverses concentrations, on met dans des tubes à essais 0,1 ml de chaque solution avec 0,9 ml de la solution de cellules, on bouche hermétiquement les tubes et on cultive à 37°C pendant 48 heures, après quoi on compte les nombres de cellules vivantes pour chaque solution échantillon aux concentrations respectives.

Comme témoin comparatif, on ajoute seulement 0,1 ml de soluté physiologique à 0,9 ml de la solution de cellules à examiner, on cultive de la même manière et on compte les nombres de cellules vivantes.

On détermine ensuite par la relation suivante les degrés (%) d'inhibition de la multiplication cellulaire pour chaque solution échantillon :

$$\begin{array}{l} \text{\% d'inhibition de la} \\ \text{multiplication} \\ \text{cellulaire} \end{array} = \left( 1 - \frac{\text{nombre de cellules} \\ \text{vivantes de l'échantillon}}{\text{nombre de cellules vi-} \\ \text{vantes du témoin}} \right) \times 100$$

En reportant en abscisses (échelle logarithmique) les concentrations des solutions échantillons sur un papier semi logarithmique et en ordonnées les degrés (%) d'inhibition de la multiplication cellulaire pour chaque solution, on détermine une concentration ( $CI_{50}$ , mg/ml) donnant 50 % d'inhibition de la multiplication cellulaire, que l'on prend comme activité anti-

tumorale in vitro de l'échantillon concerné.

On détermine l'activité anti-tumorale in vitro de l'échantillon non seulement aussitôt après sa préparation, mais aussi après une conservation à 60°C pendant  
5 6 mois dans un flacon bien fermé.

Activité anti-tumorale in vivo :

On transplante  $10^6$  cellules du carcinome ascite d'Ehrlich, par souris, à un groupe de 10 souris femelles de la souche ddy d'environ 5 semaines puis on  
10 leur inocule par la voie intrapéritonéale 0,2 ml de suspension de l'échantillon dans du soluté physiologique (échantillon préparé pour avoir une concentration en cellules sèches de 1 mg/ml), pendant 5 jours successifs, pour voir les nombres de souris qui survivent au bout  
15 de 30 jours.

Comme témoin comparatif, on inocule par la voie intrapéritonéale pendant 5 jours successifs seulement 0,2 ml de soluté physiologique, et dans ce cas aucune souris ne survit au bout de 30 jours.

20 EXEMPLE 1 :

1) Premier stade (traitement de pasteurisation au peroxyde d'hydrogène)

Après avoir ajouté 8 ml de peroxyde d'hydrogène à 10 %, on maintient à 0°C pendant 30 minutes 80 ml d'une  
25 suspension de cellules cultivée et préparée suivant l'exemple expérimental ci-dessus, puis on centrifuge pour recueillir les cellules, que l'on purifie deux fois avec 240 ml de soluté physiologique froid.

On remet ensuite les cellules en suspension  
30 dans 250 ml environ du milieu BBM froid et on ajuste pour atteindre l'absorbance 10 à 660 nm (concentration cellulaire 6 mg/ml).

2) Second stade (traitement à la pénicilline avec de la pénicilline G)

35 On prélève 200 ml de la suspension dans le milieu BBM (contenant environ 1200 mg de cellules) qui a été obtenue au premier stade précédent, et après avoir

ajouté 200 ml d'une solution aqueuse du sel potassique de pénicilline G [à 54.000 unités de ce sel par ml (soit un titre d'environ 34 mg/ml)]<sup>7</sup>, on maintient à 37°C pendant 20 minutes puis à 45°C pendant encore 30 minutes, ce qui donne 400 ml de suspension traitée à la pénicilline, dont 200 ml sont utilisés dans le troisième stade du présent essai et 100 ml dans l'exemple comparatif 2 ci-après.

3) Troisième stade (première lyophilisation)

On met respectivement dans 10 fioles de 100 ml de contenu 20 ml des 200 ml de la suspension traitée à la pénicilline (à environ 500 mg de cellules) obtenue dans le second stade, on prélyophilise à -30°C pendant 4 heures à la pression normale puis on abaisse la pression aux environs de 0,05 mmHg en ne dépassant pas la température de 20°C, pendant 4 heures, pour obtenir les préparations intermédiaires. On utilise 5 fioles de ces préparations intermédiaires dans le quatrième stade du présent essai et les 5 autres fioles dans l'exemple comparatif 1 ci-après.

4) Quatrième stade (élimination de la pénicilline)

On met dans 5 fioles de chaque préparation intermédiaire obtenue au troisième stade ci-dessus respectivement 40 ml de soluté physiologique froid, on mélange bien et on recueille par centrifugation environ 300 mg de cellules. On rassemble les cellules, on les met en suspension dans 200 ml de soluté physiologique froid et on centrifuge de nouveau, ce qui donne des cellules ne contenant plus le sel potassique de la pénicilline G.

(5) Cinquième stade ( seconde lyophilisation)

On met 240 mg des cellules sans pénicilline provenant du quatrième stade en suspension dans 80 ml environ d'un mélange d'une solution aqueuse à 2,5 % de maltose et d'une solution aqueuse à 3 % de thiosulfate de sodium dans le rapport volumique 4, en réglant la concentration cellulaire à 3 mg/ml.

On met ensuite 1 ml de la suspension (contenant 3 mg de cellules) respectivement dans plusieurs fioles de 15 ml et on lyophilise dans les mêmes conditions que pour la première lyophilisation du troisième stade, ce qui donne les préparations finales de la présente invention.

Comme le montre le tableau I ci-après, la préparation finale de cet exemple 1 (contenant 3 mg de cellules par fiole) a une faible toxicité, une bonne activité anti-tumorale et une excellente stabilité dans le temps.

EXEMPLES 2 à 5 :

Dans les essais qui suivent on effectue le traitement de pasteurisation avec de l'alcool éthylique (exemple 2), de l'alcool isopropylique (exemple 3), de l'alcool tert-butylique (exemple 4) ou de l'alcool benzylique (exemple 5) à la place du peroxyde d'hydrogène employé dans l'exemple 1.

(1) Premier stade (traitement de pasteurisation avec un monoalcool).

Dans ces exemples 2 à 5, on opère chaque fois sur 20 ml d'une suspension de cellules de culture (contenant environ 375 mg de cellules) cultivée et préparée suivant l'exemple expérimental précédent, suspension que l'on centrifuge pour rassembler les cellules.

Dans le cas de l'éthanol, de l'isopropanol et du tert-butanol qui sont très solubles dans l'eau, on met les cellules en suspension dans 20 ml d'une solution aqueuse à 80 % de l'un de ces alcools et on maintient

la suspension pendant 30 minutes entre 0 et 5°C.

Dans le cas de l'alcool benzylique peu soluble dans l'eau, on verse sur les cellules 10 ml d'alcool et 10 ml d'eau et on maintient les deux couches liquides pendant 30 minutes entre 0 et 5°C, tout en agitant bien au moyen d'un agitateur magnétique.

Dans chacun de ces exemples on centrifuge ensuite la solution alcoolique traitée pour rassembler les cellules, que l'on purifie deux fois avec 60 ml de soluté physiologique froid puis que l'on remet en suspension dans 50 ml environ du milieu BBM froid pour atteindre l'absorbance 10 à 660 nm (concentration des cellules 6 mg/ml).

(2) Second stade (traitement à la pénicilline), troisième stade (première lyophilisation), quatrième stade (élimination de la pénicilline) et cinquième stade (seconde lyophilisation).

Avec 50 ml de suspension BBM (à environ 300 mg de cellules) obtenue dans le premier stade de chacun des exemples, on procède successivement aux stades 2 à 5 exactement de la même manière que dans l'exemple 1, ce qui donne les produits ou préparations finales respectives des exemples 2 à 5.

Comme le montre le tableau 1, ces préparations finales (qui contiennent 3 mg de cellules par fiole) ont toutes une faible toxicité, une très bonne activité anti-tumorale et, en particulier, une excellente stabilité dans le temps.

#### EXEMPLE 6 :

Le traitement à la pénicilline est effectué avec l'ampicilline au lieu de pénicilline G comme dans l'exemple 1.

(1) Premier stade (traitement de pasteurisation au peroxyde d'hydrogène).

En utilisant 20 ml d'une suspension de cellules de culture (à environ 375 mg de cellules) cultivée et préparée conformément à l'exemple expérimental précédent,

on effectue le traitement au peroxyde d'hydrogène exactement de la même manière qu'à l'exemple 1 pour obtenir la suspension dans le milieu BBM.

(2) Second stade (traitement avec l'ampicilline).

5                    On ajoute 50 ml d'une solution aqueuse d'ampicilline (sel sodique de l'aminobenzyl pénicilline) au titre de 60 mg/ml d'ampicilline) à 50 ml de la suspension BBM à environ 375 mg de cellules obtenue dans le premier stade, et on maintient le mélange à 37°C pendant 30 minutes puis à 45°C pendant encore 30 minutes, ce qui donne 100 ml de suspension traitée à la pénicilline.

(3) Troisième stade (première lyophilisation), quatrième stade (élimination de la pénicilline) et cinquième stade (seconde lyophilisation).

15                   En opérant exactement de la même manière que dans l'exemple 1 on effectue les stades 3 à 5 sur la suspension traitée à la pénicilline (contenant environ 300 mg de cellules) résultant du second stade pour obtenir la préparation finale.

20                   Comme le montre encore le tableau 1, cette préparation, qui contient 3 mg de cellules par fiole, a une faible toxicité et une excellente activité anti-tumorale, ainsi qu'une bonne stabilité dans le temps.  
EXEMPLE COMPARATIF 1 :

25                   Dans cet exemple comparatif on supprime le quatrième stade, c'est-à-dire l'élimination de la pénicilline.

                    On met en suspension le contenu de cinq fioles de la préparation intermédiaire (contenant environ 300 mg de cellules, et une forte proportion de pénicilline G) obtenue dans le troisième stade (première lyophilisation) de l'exemple 1, tel quel, c'est-à-dire sans en avoir enlevé la pénicilline, dans 100 ml environ d'un mélange d'une solution aqueuse à 2,5 % de maltose et d'une solution aqueuse à 3 % de thiosulfate de sodium, dans le rapport volumique 4, de la même manière que dans le cas du cinquième stade de l'exemple 1, de

manière à avoir une teneur en cellules de 3 mg/ml, et on lyophilise la suspension dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 1.

Comme le montre le tableau 1, la préparation de cet exemple comparatif 1, contenant 3 mg de cellules dans une fiole, montre une toxicité aiguë et elle conserve mal sa stabilité.

EXEMPLE COMPARATIF 2 :

Dans cet exemple comparatif on élimine la pénicilline avant le troisième stade (première lyophilisation) de l'exemple 1, cet exemple comparatif étant conduit de la manière suivante.

Des 400 ml de la suspension traitée à la pénicilline (second stade de traitement avec la pénicilline G) de l'exemple 1 on prélève 100 ml (contenant environ 300 mg de cellules) et on centrifuge pour rassembler les cellules, qui sont purifiées deux fois avec 200 ml de soluté physiologique froid, ce qui donne des cellules sans pénicilline G.

Ces cellules (environ 240 mg) sont mises en suspension dans 80 ml de BBM froid et la suspension est lyophilisée dans les mêmes conditions que pour la première lyophilisation (troisième stade) de l'exemple 1. Le produit est ensuite remis en suspension dans 80 ml d'un mélange d'une solution aqueuse à 2,5 % de maltose et d'une solution aqueuse à 3 % de thiosulfate de sodium dans le rapport volumique 4, de la même manière que dans le cas de la seconde lyophilisation (premier stade) de l'exemple 1, et on lyophilise la suspension de la même manière.

Comme le montre le tableau 1, la préparation obtenue dans cet exemple comparatif 2, contenant 3 mg de cellules dans une fiole, a une activité anti-tumorale nettement faible.

T A B L E A U 1

| Résultats des<br>mesures<br><br>Préparations | Teneur en pénicilline<br>(unités de pénicilline par fiole) | - DL <sub>50</sub><br>(mg/kg) | Activité anti-tumorale aussitôt après la préparation |                              | Activité anti-tumorale après une conservation de 6 mois à 60°C |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------------------------|
|                                              |                                                            |                               | in vivo*                                             | in vitro (CI <sub>50</sub> ) | in vitro (CI <sub>50</sub> )                                   |
| Exemple 1                                    | 0                                                          | > 50                          | 10/10                                                | 0,012                        | 0,018                                                          |
| Exemple 2                                    | 0                                                          | > 50                          | 10/10                                                | 0,003                        | 0,004                                                          |
| Exemple 3                                    | 0                                                          | > 50                          | 10/10                                                | 0,004                        | 0,006                                                          |
| Exemple 4                                    | 0                                                          | > 50                          | 10/10                                                | 0,003                        | 0,004                                                          |
| Exemple 5                                    | 0                                                          | > 50                          | 10/10                                                | 0,002                        | 0,003                                                          |
| Exemple 6                                    | 0                                                          | > 50                          | 10/10                                                | 0,018                        | 0,023                                                          |
| Exemple comparatif 1                         | 27,000                                                     | 15                            | 10/10                                                | 0,015                        | > 0,3                                                          |
| Exemple comparatif 2                         | 0                                                          | > 50                          | 2/10                                                 | > 0,3                        | > 0,3                                                          |

\* Nombre de souris qui survivent/nombre de souris par essai.

## Notes :

- 5 (1) Exemple 1 : la pasteurisation au peroxyde d'hydrogène (premier stade), le traitement avec le sel potassique de la pénicilline G (second stade), la première lyophilisation (troisième stade), l'élimination de la pénicilline G (quatrième stade) et la seconde lyophilisation (cinquième stade) sont effectués successivement dans cet ordre.
- 10 (2) Exemples 2 à 5 : les essais sont effectués exactement de la même manière que dans l'exemple 1 sauf que pour la pasteurisation (premier stade) le peroxyde d'hydrogène est remplacé par de l'éthanol (exemple 2) , de l'isopropanol (exemple 3),
- 15 du tert-butanol (exemple 4) ou de l'alcool benzylique (exemple 5).
- 20 (3) Exemple 6 : l'essai est effectué exactement comme dans l'exemple 1 à part que le sel potassique de la pénicilline G est remplacé par de l'ampicilline dans le second stade.
- (4) Exemple comparatif 1 : l'essai est effectué exactement de la même manière que dans l'exemple 1 sauf que l'élimination de la pénicilline (quatrième stade) est supprimée.
- 25 (5) Exemple comparatif 2 : la pénicilline est éliminée aussitôt après le second stade (traitement à la pénicilline) puis on effectue la première et la seconde lyophilisations.

## R E V E N D I C A T I O N S

1.- Procédé de préparation d'un agent anti-tumoral consistant à soumettre des cellules de culture de souches appartenant à Streptococcus pyogenes, successivement dans l'ordre suivant, à un traitement de pasteurisation (premier stade) et à un traitement à la pénicilline (second stade), puis à une première lyophilisation (troisième stade), ce qui donne une préparation intermédiaire que l'on soumet ensuite à un traitement d'élimination de la pénicilline (quatrième stade) et enfin à une seconde lyophilisation (cinquième stade).

2.- Procédé selon la revendication 1, dans lequel on part d'une ou de plusieurs souches choisies parmi St. pyogenes ATCC N° 21060, St. pyogenes ATCC N° 21059, St. pyogenes IID S-43 et St. Pyogenes de IID T-3.

3.- Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel pour le traitement de pasteurisation (premier stade), on traite les cellules de culture avec du peroxyde d'hydrogène ou un monoalcool.

4.- Procédé selon la revendication 3, dans lequel le traitement au peroxyde d'hydrogène est effectué entre -5°C et 10°C.

5.- Procédé selon la revendication 3, dans lequel les cellules sont traitées à 50°C ou moins avec, comme monoalcools, des alcools ou thio-alcools aliphatiques en C<sub>1</sub> à C<sub>12</sub>.

6.- Procédé selon la revendication 3, dans lequel les cellules sont traitées à 50°C ou moins avec de l'éthanol.

7.- Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel on effectue le traitement à la pénicilline (second stade) en mettant les cellules en suspension dans un milieu aqueux contenant de la pénicilline, en particulier dans des solutions aqueuses de sels ou dans le milieu dit milieu basal de Bernheimer.

8.- Procédé selon la revendication 7, dans lequel la teneur en pénicilline du milieu aqueux est de 5 à 50 mg (titre)/ml.

5 9.- Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel on élimine la pénicilline (quatrième stade) en mettant la préparation intermédiaire résultant des stades 1 à 3 en suspension dans un milieu aqueux, en particulier dans des solutions aqueuses de sels ou dans le milieu de Bernheimer.

10 10.- Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel la seconde lyophilisation (cinquième stade) est effectuée par des méthodes courantes après que la pénicilline a été éliminée.

15 11.- Procédé selon la revendication 10, dans lequel on effectue la seconde lyophilisation après avoir mélangé un stabilisant et/ou un véhicule avec les cellules provenant du quatrième stade (stade d'élimination de la pénicilline).