



CONFÉDÉRATION SUISSE  
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑤① Int. Cl.<sup>3</sup>: A 61 K 35/74  
C 12 P 1/04  
// C 12 R 1/265

**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

**646 873**

⑳ Numéro de la demande: 2985/80	㉓ Titulaire(s): Rhône-Poulenc Industries, Paris 8e (FR)
㉒ Date de dépôt: 17.04.1980	
㉔ Priorité(s): 18.04.1979 FR 79 09743	㉗ Inventeur(s): Florent, Jean, Boulogne-Billancourt (FR) Lunel, Jean, Paris (FR) Mancy, Denise (-Courtillet), Charenton (FR) Vuillemin, Bernard, Yerres (FR)
㉖ Brevet délivré le: 28.12.1984	
㉙ Fascicule du brevet publié le: 28.12.1984	㉚ Mandataire: Kirker & Cie SA, Genève

**⑤④ Substance biologiquement active, sa préparation et les médicaments qui la contiennent.**

⑤⑦ Une nouvelle substance hydrosoluble désignée par le numéro 41200 RP est obtenue à partir de cellules de *Micrococcus sedogenes*, souche M 78 (NRRL B-3505).

Cette nouvelle substance est particulièrement utile en thérapeutique humaine ou vétérinaire pour augmenter la résistance aux infections d'origines diverses et pour stimuler les défenses naturelles de l'organisme.

## REVENDEICATIONS

1. Substance désignée par le numéro 41200 RP, caractérisée en ce qu'elle consiste en une poudre blanche amorphe constituée, à l'état anhydre, essentiellement par 11 à 18% d'acides aminés, 10 à 17% de glucose, 10 à 17% de sucres aminés et moins de 5% d'acides nucléiques, et dont la composition élémentaire est voisine de: C % = 45-47, H % = 7,1-7,6, O % = 35-38, N % = 4,0-5,7, P % = 0,9-1,2, Cl % = 0,1-0,4, S % inférieur à 0,5, Na % = 2,0-3,0, Ca % = 0,9-1,9 et qui possède des propriétés immunostimulantes.

2. Procédé de préparation de la substance 41200 RP, caractérisé en ce que:

a) l'on traite par le lysozyme, à un pH constant compris entre 6,5 et 8, pendant 1 à 3 h et à une température voisine de 37°C, une suspension aqueuse de cellules de *Micrococcus sedogenes*, souche M 78 (NRRL B-3505),

b) l'on isole un produit brut, sous forme salifiée, de la phase liquide de la suspension obtenue et le purifie par traitement au chlorure de calcium pour obtenir la substance 32919 RP, et

c) l'on purifie la substance 32919 RP par traitement de sa solution aqueuse par le phénol suivi de fractionnement sur tamis moléculaire en recueillant la fraction de haut poids moléculaire dont on isole la substance 41200 RP.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'on utilise entre 2 et 20 mg de lysozyme par gramme de cellules mises en jeu.

4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que, lorsqu'on effectue la purification au moyen de chlorure de calcium, on utilise 5 à 50 g de chlorure de calcium par litre de solution du produit à purifier.

5. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que, lorsqu'on purifie la substance 32919 RP en solution aqueuse, on utilise une solution aqueuse de phénol contenant environ 90% de phénol.

6. Médicament, caractérisé en ce qu'il est constitué par le produit selon la revendication 1 en association avec un ou plusieurs diluants ou adjuvants compatibles et pharmaceutiquement acceptables.

7. Médicament selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il comprend également un ou plusieurs autres produits thérapeutiquement actifs.

La présente invention concerne une nouvelle substance biologiquement active, désignée par le numéro 41200 RP, obtenue à partir de cellules isolées de la culture d'un nouveau micro-organisme, désigné par l'appellation *Micrococcus sedogenes* M 78, son procédé de préparation et les médicaments qui la contiennent.

La substance 41200 RP selon la présente invention, qui est obtenue après traitement par le lysozyme des cellules isolées de *Micrococcus sedogenes* souche M 78, précipitation des impuretés par le chlorure de calcium, élimination des protéines par traitement au phénol suivie d'un fractionnement sur tamis moléculaire, est constituée essentiellement par 11 à 18% d'acides aminés (dont 5,5 à 7,5% d'alanine), 10 à 17% de glucose, 10 à 17% de sucres aminés et moins de 5% d'acides nucléiques.

Généralement isolée avec une teneur en eau comprise entre 2 et 6%, la substance 41200 RP est une poudre blanche hydrosoluble amorphe contenant du carbone, de l'hydrogène, de l'oxygène, de l'azote, du phosphore, du soufre, du chlore, du sodium et du calcium. Sa composition élémentaire (calculée sur sec) est voisine de: C % = 45-47, H % = 7,1-7,6, O % = 35-38 (par différence), N % = 4,0-5,7, P % = 0,9-1,2, Cl % = 0,1-0,4, S % inférieur à 0,5, Na % = 2,0-3,0, Ca % = 0,9-1,9.

Le procédé de préparation de la substance 41200 RP consiste essentiellement à traiter par le lysozyme, dans des conditions de tem-

pérature, de pH et de durée déterminées et précisées ci-après, une suspension aqueuse de cellules (de préférence préalablement séchées et éventuellement traitées à pH voisin de 3 et à une température voisine de 120°C pendant 30 à 60 min) isolées de cultures de *Micrococcus sedogenes* souche M 78, à isoler sous forme salifiée le produit brut à partir de la phase liquide de la suspension obtenue, à le purifier par précipitation progressive d'impuretés au moyen de chlorure de calcium puis par traitement au phénol pour éliminer essentiellement la plus grande partie des protéines, et enfin par fractionnement sur un tamis moléculaire en recueillant la fraction de haut poids moléculaire, c'est-à-dire compris entre  $5 \cdot 10^5$  et  $5 \cdot 10^6$ .

Généralement, le lysozyme est utilisé à raison de 2 à 20 mg/g de cellules séchées mises en jeu. Le traitement s'effectue à un pH constant compris entre 6,5 et 8, de préférence voisin de 7, pendant 1 à 3 h, de préférence pendant 2 h, et à une température voisine de 37°C tout en agitant énergiquement.

La phase liquide de la suspension obtenue est généralement séparée par centrifugation et les produits de faibles poids moléculaires en solution sont éliminés soit par dialyse à travers une membrane de porosité convenable, soit par ultrafiltration. La substance brute ainsi obtenue peut être isolée sous forme salifiée par lyophilisation de sa solution. A ce stade de la préparation, la substance obtenue est constituée essentiellement par des protéines, des acides nucléiques, des sucres aminés et moins de 5% de polysaccharides, et sa composition élémentaire est voisine de:

C % = 41,5-44,9, H % = 5,6-5,9, O % = 29,4-32,2, N % = 11,2-12,6, P % = 3,2-4,4, S % = 0,1-0,5, Cl % = 0,2-0,4, cendres sulfuriques % = 11,4-15,4.

La substance brute est purifiée, en solution dans l'eau à une concentration comprise entre 10 et 40 g/l, de préférence 20 g/l, par addition d'une solution concentrée de chlorure de calcium jusqu'à l'obtention d'une concentration finale en chlorure de calcium comprise entre 5 et 50 g/l, de préférence 10 g/l. Le précipité formé est éliminé par centrifugation et la solution résultante est dialysée (ou ultrafiltrée) puis traitée par une résine échangeuse d'ions portant une fonction acide sulfonique sous forme alcaline. La substance obtenue, désignée par le numéro 32919 RP, peut être séparée de la solution aqueuse par lyophilisation.

La substance 32919 RP est constituée essentiellement par 24 à 33% d'acides aminés, 26 à 33% d'acides nucléiques, 11 à 17,5% de sucres aminés (détermination selon la méthode Elson-Morgan et expression des résultats en glucosamine) et 2,8 à 4,3% de polysaccharides, et sa composition est voisine de:

C % = 44-48, H % = 5,2-6,7, O % = 29-33, N % = 10,0-11,6, P % = 2,3-3,7, S % inférieur à 0,5, Na % = 3,0-3,8, Ca % = 0,15-0,50.

La substance 32919 RP est à nouveau purifiée en opérant de la manière suivante:

Une solution aqueuse de la substance 32919 RP, dont la concentration en substance 32919 RP est comprise entre 10 et 50 g/l, de préférence 25 g/l, est lavée par un volume égal d'un mélange phénol/eau (contenant de préférence 10% d'eau) pendant 15 à 60 min, de préférence 30 min, à une température voisine de 65°C. Après refroidissement, la phase aqueuse séparée est lavée par un solvant chloré, de préférence le chloroforme, jusqu'à élimination du phénol dissous, puis est dialysée contre de l'eau distillée. La phase aqueuse contenant la substance active est lyophilisée.

Le produit ainsi obtenu est mis en solution dans l'eau tamponnée à pH 7 au moyen d'un acétate alcalin tel que l'acétate de sodium. La solution ainsi obtenue est soumise à un fractionnement sur tamis moléculaire à haute porosité tel que Ultragel Ac A 22 de l'Industrie biologique française, Sepharose 4 B ou Sepharose CL 4B de la société Pharmacia, en recueillant la fraction de haut poids moléculaire. La substance 41200 RP est alors isolée de sa solution par lyophilisation après dialyse prolongée contre de l'eau déminéralisée.

Le micro-organisme *Micrococcus sedogenes*, souche M 78, dont la culture dans des conditions appropriées fournit les cellules qui sont utilisées pour la préparation du 41200 RP, doit être considéré comme une espèce nouvelle qui appartient au genre *Micrococcus*.

Il a été isolé à partir d'un échantillon de terre prélevé au Brésil selon les méthodes habituelles d'isolement des micro-organismes. Un échantillon de cette souche a été déposé au Northern Regional Research Laboratory de l'U.S. Department of Agriculture à Peoria, Ill. (Etats-Unis), où il a été enregistré le 14 août 1968 sous le numéro NRRL B-3505.

Ce laboratoire est autorisé à distribuer la souche à toute personne ayant licitement connaissance du présent document.

Les caractères de ce micro-organisme ont été déterminés conformément aux différentes méthodes d'identification résumées dans «Manual of Microbiological Methods», Society of American Bacteriologists, Mc Graw-Hill Book Company, New York (1957), ainsi que dans les ouvrages suivants: J. Dumas, «Bactériologie Médicale», Ed. médicales Flammarion, Paris (1951); S. Lambin et A. German, «Précis de Microbiologie», Collection des Précis de Pharmacie, Masson, Paris (1961); H. Cassagne, «Milieux de culture», Ed. de la Tourelle, Paris (1961); Skerman, «Guide to the Identification of the Genera of Bacteria», The Williams and Wilkins Company, Baltimore (1967).

La détermination du genre a été faite selon la clé d'identification du «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology», 7<sup>e</sup> éd., The Williams and Wilkins Company, Baltimore (1957).

L'étude des caractères morphologiques de la souche M 78 a été effectuée sur des cultures statiques de 24 h à 26°C. Ces cultures sont constituées par des cellules cocciformes Gram positives, non acidorésistantes, immobiles, de 1 à 1,3 µ de diamètre, isolées ou groupées par deux ou quatre cellules, ou en chaînettes de 4 à 16 cellules, ou bien encore en amas irréguliers de 20 à 50 cellules. La présence de spores n'a pas été observée.

Les cultures sur gélose nutritive inclinée ont l'aspect d'un enduit gras abondant, lisse ou très peu rugueux, inodore, non chromogène, ayant une consistance molle. Les cultures sur gélose nutritive en boîtes de Petri se présentent sous forme de colonies circulaires, à bords réguliers, à surface lisse; ces colonies sont aplaties ou légèrement convexes, plus ou moins opaques.

Les cultures en bouillon nutritif glucosé sont modérément troubles, sans pigment, inodores, avec un sédiment floconneux.

Cultivée sur pomme de terre, la souche M 78 forme un enduit gras, lisse, blanc jaunâtre très pâle, sans noircissement de la pomme de terre ni pigment soluble.

L'étude des caractères biochimiques a été effectuée sur des cultures incubées à 26°C. L'ensemble des résultats observés se résume de la manière suivante:

- Type respiratoire: aérobie strict
- Réduction des nitrates en nitrites: positif
- Chromogénèse: négatif
- Production d'indole: négatif
- Production de H<sub>2</sub>S: négatif
- Liquéfaction de la gélatine: négatif en 21 d
- Hydrolyse de la caséine: positif
- Test au rouge de méthyle: négatif
- Recherche de l'acétylméthylcarbinol (réaction de Voges-Proskauer): négatif
- Culture sur lait écrémé: pas de coagulation, pas de peptonisation, alcalinisation du milieu de pH 6,1 à pH 7,5 entre le 1<sup>er</sup> et le 21<sup>e</sup> d
- Température optimale de développement:
  - 4°C - pas de développement
  - 22°C - bon développement
  - 26°C - très bon développement
  - 30°C - bon développement
  - 37°C - développement médiocre
  - 45°C - pas de développement
- Catalase: positif
- Oxydase: négatif
- Formation d'acides à partir des glucides et polyalcools suivants (en aérobie et anaérobie) décelée par virage du rouge de phénol:

- glucose: négatif
- galactose: négatif
- arabinose: négatif
- saccharose: négatif
- lactose: négatif
- mannitol: négatif
- glycérol: négatif
- Hydrolyse de l'amidon: positif
- Milieu à l'esculine: pas de noircissement
- Culture sur milieu additionné de fortes concentration du NaCl:
  - 4% NaCl: développement moyen
  - 10% NaCl: pas de développement
- Utilisation de l'urée comme seule source d'azote: négatif
- Uréase: négatif
- Hydrolyse de la chitine: négatif
- Culture sur milieu pour autotrophe [avec (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> comme seule source d'azote]: pas de développement; pas de formation de nitrites à partir de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>
- En suivant le principe de la méthode de Pridham [«Journal of Bacteriology», 56, 107-114 (1948)], pour la souche M 78 sont bien ou moyennement utilisées, comme sources de carbone, les substances suivantes: amidon, éthanol, acétate de sodium, propionate de sodium, acide succinique, acide malique, citrate de sodium, pyruvate de sodium. Ne sont pas utilisés ou ne permettent qu'un développement pauvre: ribose, arabinose, glucose, lactose, maltose, saccharose, tréhalose, glycérol, mannitol, inositol, acide glutarique, tartrate de sodium, acide galacturonique.
- La recherche des sources d'azote utilisables par la souche M 78 pour son développement a été faite selon cette même méthode de Pridham, en utilisant le citrate de sodium comme source de carbone et en remplaçant NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> du milieu de base par divers composés azotés. Dans ces conditions, les composés suivants sont bien ou moyennement utilisés: NaNO<sub>3</sub>, NaNO<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, DL asparagine, succinimide, glycine, DL alanine, acide DL aspartique, acide DL (+) glutamique, L (-) tyrosine, DL proline. Ne sont pas utilisés: adénine, uracile, créatinine, D (+) glucosamine, sarcosine, L (+) arginine, DL méthionine, bétaïne.

En se rapportant à la clé d'identification du «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology», 7<sup>e</sup> éd., The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1957, le fait que les cellules bactériennes étudiées ne contiennent pas de pigments photosynthétiques, qu'elles soient incapables de se développer sur un milieu pour autotrophes, qu'elles se reproduisent par scissiparité, qu'elles soient sphériques, isolées, en courtes chaînettes ou en amas irréguliers, et qu'elles ne possèdent pas de trichomes, permet de classer la souche M 78 dans l'ordre des *Eubacteriales* (Buchanan, 1917).

D'autre part, la bactérie M 78 est sphérique, Gram positive, aérobie stricte, elle réduit les nitrates en nitrites, est incapable de fermenter les glucides en anaérobiose et ne forme pas de spores: ces caractères permettent de la ranger dans la famille des *Micrococcaceae* (Pribram, 1929).

Cette famille est divisée en six genres répartis en deux groupes selon le type respiratoire: cette distinction permet de classer la bactérie M 78 dans le premier groupe qui comprend les genres *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Gaffkya* et *Sarcina*. Ce groupe est scindé en deux sous-groupes caractérisés par la façon dont les cellules sont groupées. Les cellules bactériennes étudiées ne se présentent pas systématiquement en tétrades ou en paquets de huit cellules: cette propriété conduit à classer la souche M 78 soit dans le genre *Micrococcus*, soit dans le genre *Staphylococcus*.

Un grand nombre de caractères, et en particulier le fait que la souche M 78 soit incapable de fermenter le glucose en anaérobiose et qu'elle soit aérobie stricte, permet de la rattacher au genre *Micrococcus*.

Afin de donner plus de précision à la détermination du genre, on a effectué, pour de nombreux tests, des comparaisons avec *Staphylococcus aureus* 209 P, *Neisseria catarrhalis* A 152 (IP), *Streptococcus*

*faecalis* ATCC 8043, *Streptococcus faecalis* ATCC 9790, ce qui a permis d'éliminer ces différents genres à cellules cocciiformes, et dont certains appartiennent à d'autres familles que les *Micrococcaceae*.

Parmi les 16 espèces décrites appartenant au genre *Micrococcus*, celles dont pourrait se rapprocher le plus la souche M 78 sont les suivantes: *Micrococcus varians*, *Micrococcus caseolyticus* et *Micrococcus colpogenes*.

La souche M 78 diffère notamment de *Micrococcus varians* par la non-formation d'acides à partir du glucose, du lactose, du saccharose, du glycérol, du mannitol et par la non-acidification du lait.

Elle diffère de *Micrococcus caseolyticus* par l'absence de liquéfaction de la gélatine, de peptonisation du lait, et de production d'acides à partir du glucose, du lactose, du mannitol, du glycérol.

La souche M 78 est également différente de *Micrococcus colpogenes* par le fait essentiel qu'elle ne peut hydrolyser la chitine, et qu'elle est de plus uréase-négative.

La souche étudiée présente en définitive avec les espèces décrites du genre *Micrococcus* des différences qui permettent de la considérer comme une espèce nouvelle.

Le procédé de préparation des cellules utilisées pour la préparation du 41200 RP consiste à cultiver *Micrococcus sedogenes*, souche M 78, sur un milieu et dans des conditions appropriées, puis à séparer les cellules qui se sont multipliées au cours de la culture.

La culture de *Micrococcus sedogenes*, souche M 78, peut être effectuée par toute méthode de culture aérobie en surface ou en profondeur, mais cette dernière est à préférer pour des raisons de commodité. On utilise à cette fin les techniques d'ensemencement et de fermentation et les différents types d'appareils qui sont d'un usage courant dans l'industrie des fermentations.

Le milieu de fermentation doit contenir essentiellement des sources de carbone, d'azote, de phosphore et de soufre assimilables, des éléments minéraux et éventuellement des facteurs de croissance, tous ces éléments pouvant être apportés sous forme de produits bien définis ou par des mélanges complexes tels qu'on en rencontre dans les produits biologiques d'origines diverses.

Comme sources de carbone assimilable, on peut utiliser des hydrates de carbone tels que les dextrines, l'amidon ou d'autres substances carbonées comme des alcools (éthanol) ou comme certains acides organiques: acides lactique, citrique. Certaines huiles animales ou végétales comme l'huile de lard ou l'huile de soja peuvent remplacer avantageusement ces différentes sources carbonées ou leur être adjoindues.

Les sources convenables d'azote assimilable sont extrêmement variées. Elles peuvent être des substances chimiques très simples comme les sels minéraux ou organiques d'ammonium, certains acides aminés. Elles peuvent être aussi apportées par des substances complexes contenant principalement l'azote sous forme protidique: caséine, lactalbumine, gluten et leurs hydrolysats, farines de soja, d'arachide, de poisson, extraits de viande, de levure, résidus solubles de distillation d'alcool de grain, liqueur de trempage de maïs.

Le soufre et le phosphore sont généralement apportés en quantité suffisante par les substances complexes mentionnées ci-avant. Ils peuvent être également apportés sous forme de sulfates et phosphates.

Parmi les éléments minéraux ajoutés, certains peuvent avoir un effet tampon ou neutralisant, comme les phosphates alcalins ou alcalino-terreux ou les carbonates de calcium ou de magnésium. D'autres apportent l'équilibre ionique nécessaire au développement de *Micrococcus sedogenes*, souche M 78, comme les chlorures et sulfates des métaux alcalins et alcalino-terreux ou les sels de zinc, de cobalt, de fer, de cuivre, de manganèse.

Le pH du milieu de fermentation au départ de la culture doit être compris entre 6,0 et 7,8 et de préférence entre 6,5 et 7,5. La température optimale pour la fermentation est comprise entre 25 et 30°C, mais une production satisfaisante est obtenue pour des températures comprises entre 20 et 35°C.

L'aération de la fermentation peut varier entre des valeurs assez larges. On a cependant trouvé que des aérations de 0,3 à 3 l d'air par

litre de bouillon et par minute conviennent particulièrement bien. Le rendement maximal est obtenu après 8 à 20 h de culture, de préférence après 15 h, ce temps dépendant essentiellement du milieu utilisé.

Le pH du milieu de fermentation à la fin de la culture est généralement compris entre 7,3 et 8,8, et il est préférable qu'il soit compris entre 8,0 et 8,4.

Le micro-organisme *Micrococcus sedogenes*, souche M 78, est ensuite séparé du milieu de fermentation par filtration ou centrifugation, avantageusement après avoir acidifié ce dernier jusqu'à un pH voisin de 3 par addition d'un acide minéral tel que l'acide chlorhydrique. Pour les traitements ultérieurs, on peut soit utiliser les cellules brutes ainsi obtenues, soit effectuer une déshydratation par lyophilisation ou par lavage à l'alcool ou à l'acétone, puis un séchage sous pression réduite pour obtenir des cellules sèches purifiées. Il peut être particulièrement avantageux de soumettre les cellules obtenues à un chauffage à une température comprise entre 120 et 130°C pendant 30 à 60 min avant leur utilisation ultérieure.

La nouvelle substance 41200 RP selon la présente invention présente des propriétés biologiques remarquables et utiles.

Administrés par voie intraveineuse, sous-cutanée, intrapéritonéale ou intranasale à des souris, la substance selon l'invention augmente de manière significative la résistance des souris à l'infection par des doses normalement mortelles de souches virulentes de bactéries telles que *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et de virus tels que le virus de l'encéphalomyocardite, de l'hépatite murine, de la grippe (virus humains adaptés à la souris, type Ao et A<sub>2</sub>), de l'herpès et de l'arbovirus Semliki-Forest. L'état de résistance accrue persiste au moins 96 h après le traitement.

Administré par voie parentérale à des souris, ce produit stimule fortement le pouvoir phagocytaire du système réticulo-endothélial et augmente, au niveau de la rate, le nombre de lymphocytes producteurs d'anticorps. Il exerce un effet stimulant sur les réactions d'hypersensibilité de type retardé et de production d'anticorps vis-à-vis d'antigènes particulaires.

Chez la souris greffée avec des cellules tumorales (telles que des cellules du sarcome 180), ce produit favorise le rejet des tumeurs en provoquant une réaction nécrotique à leur niveau.

Dans certaines conditions, le produit selon l'invention augmente le nombre et/ou l'activité cytolytique des lymphocytes T de la rate vis-à-vis de cellules tumorales allogéniques.

Chez l'animal (souris), selon les systèmes expérimentaux utilisés et les voies d'administration, les doses actives sont généralement comprises entre 0,03 et 3 mg/kg et de préférence entre 0,3 et 1 mg/kg. Généralement, un seul traitement suffit pour obtenir l'effet recherché pendant une période d'au moins 48 h.

Chez la souris, par voie intraveineuse, la dose létale 50% (DL<sub>50</sub>) du 41200 RP est voisine de 23 mg/kg.

Dans ce qui suit :

- les protéines sont exprimées d'après l'analyse des acides aminés,
  - le glucose est déterminé par la méthode à l'anthrone,
  - le phosphore est dosé par la méthode au molybdate après minéralisation,
  - la teneur en acides nucléiques est déterminée par l'absorbance à 258 nm,
  - les sucres aminés sont dosés par la méthode de Elson-Morgan et exprimés en glucosamine, soit par dosage à la ninhydrine après hydrolyse et séparation à l'aide d'un autoanalyseur Biotronik LC 6000 E.
- Les exemples suivants, donnés à titre non limitatif, montrent comment l'invention peut être mise en pratique.

#### Exemple 1:

##### A) Préparation des cellules

On charge dans un fermenteur de 170 l:

- |                     |        |
|---------------------|--------|
| — peptone           | 1200 g |
| — extrait de viande | 600 g  |

- huile de soja 1200 cm<sup>3</sup>
- eau de ville, complément pour 110 l

Le pH est ajusté à 6,90 par addition de soude 10N, puis on stérilise le milieu par barbotage de vapeur à 122°C pendant 40 min. Après refroidissement, du fait de la condensation de la vapeur au cours de la stérilisation, le volume du bouillon est de 120 l; le pH du milieu est de 6,70. On ensemence avec 200 cm<sup>3</sup> d'une culture en erlenmeyer agité de *Micrococcus sedogenes*, souche M 78.

La culture est développée à 27°C pendant 14 h en agitant et en aérant avec de l'air stérile; elle est alors convenable pour l'ensemencement de la culture productrice.

La culture productrice est effectuée dans un fermenteur de 800 l chargé avec les substances suivantes:

- acide L-lactique 4 kg
- huile de soja 2 l
- sulfate d'ammonium 2,4 kg
- chlorure de sodium 2 kg
- phosphate monopotassique 0,4 kg
- sulfate de magnésium, 7H<sub>2</sub>O 0,8 kg
- sulfate de cuivre, 5H<sub>2</sub>O 0,02 kg
- sulfate de zinc, 7H<sub>2</sub>O 0,012 kg
- chlorure de cobalt, 6H<sub>2</sub>O 0,008 kg
- eau de ville, complément pour 370 l

Le pH du milieu est ajusté à 7,10 par addition de 2950 cm<sup>3</sup> de soude 10N, puis on stérilise le bouillon par barbotage de vapeur à 122°C pendant 40 min. Après refroidissement, du fait de la condensation de la vapeur au cours de la stérilisation, le volume du bouillon est de 400 l; son pH, égal à 4,20, est ajusté à 6,60 par addition de 2100 cm<sup>3</sup> d'une solution aqueuse de soude 5N.

On ensemence alors avec 40 l de la culture inoculum en fermenteur de 170 l décrite ci-dessus. La culture est développée à 27°C durant 16 h en agitant avec une turbine tournant à 205 tr/min et en aérant avec un volume d'air stérile de 15 m<sup>3</sup>/h.

En fin d'opération, le pH de la culture est de 8,20 et le volume du bouillon de 440 l.

Le moût ainsi obtenu est refroidi à +4°C et son pH est ajusté à 3 par addition de 4 l d'acide chlorhydrique 5N. Les cellules sont isolées par centrifugation à 4000 tr/min (2900 g<sup>+</sup>).

Les cellules sont reprises avec 80 l d'éthanol à -10°C en agitant pendant 15 min, puis isolées par centrifugation et séchées à 35°C sous pression réduite (5 mm de mercure) pendant 15 h.

On obtient ainsi 1500 g de cellules sèches.

#### B) Préparation du 32919 RP

1 kg de cellules préparées comme décrit en A sont mises en suspension dans 40 l d'eau distillée stérile, dans un réacteur en acier inoxydable muni d'une double enveloppe thermostatée par circulation d'eau et d'une agitation centrale énergétique. Le pH est ajusté à 7,0 par addition de soude 10N.

On ajoute alors 2 g de lysozyme et on agite pendant 2 h à 37°C en réajustant périodiquement le pH à 7,0 par addition de soude 5N.

Le mélange est alors centrifugé sur machine Sharples M16 (2 passages successifs à 17 000 tr/min avec un débit de 30 l/h). Le surnageant (37 l) est ultrafiltré (appareil UFP 20 équipé d'une membrane acrylique IRIS 3042) en recyclant le rétentat et en ajoutant 3 fois 40 l d'eau déminéralisée, refroidie à +4°C.

On recueille ainsi 7 l de rétentat concentré et débarrassé de ses petites molécules (PM inférieur à 25 000 daltons environ). Son pH est réajusté à 7 par une solution de soude 5N, puis la solution obtenue est lyophilisée.

On obtient ainsi 147 g de produit brut.

31 g de ce produit sont dissous dans 1550 cm<sup>3</sup> d'eau déminéralisée à une température voisine de 20°C en agitant pendant 30 min; on ajoute alors, en 5 min et en agitant constamment, 31 cm<sup>3</sup> d'une solution aqueuse à 668 g/l de chlorure de calcium dihydraté; on maintient l'agitation pendant 30 min. Le précipité formé est éliminé par centrifugation sur machine Sharples de laboratoire à 40 000 tr/min

avec un débit de 5 l/h. Le surnageant est dialysé sur membrane cellulosique pendant 3 d à +4°C contre 3 fois 40 l d'eau déminéralisée.

Le rétentat est alors traité dans un ballon par 310 cm<sup>3</sup> de résine polystyrène sulfonique Dowex 50 X2 en cycle sodium, en agitant pendant 1 h; la résine est filtrée et lavée sur filtre par 310 cm<sup>3</sup> d'eau.

Les eaux de lavage sont jointes au filtrat et l'ensemble est lyophilisé.

On obtient ainsi 17 g de 32919 RP sous forme salifiée dont les caractéristiques sont les suivantes:

- 10 — Aspect: poudre blanche
- Composition: eau (Fischer) % = 15,7
- sur sec: — protéines % (somme des acides aminés) = 24,6
- polysaccharides % = 3,9
- acides nucléiques % = 28,9 d'après le spectre UV

#### 15 Analyse élémentaire:

C % = 46,30, H % = 5,84, O % = 30,71 (par différence),  
N % = 10,04, P % = 3,11, S % inférieur à 0,5, Na % = 3,70,  
Ca % = 0,30

#### 20 C) Purification du 31219 RP

25 g de la substance 32919 RP obtenue dans les conditions de l'exemple B sont dissous dans 1 l d'eau déminéralisée contenue dans un réacteur de 2 l muni d'une agitation et d'un dispositif de régulation de température; on ajoute 1 l de mélange phénol/eau (109 cm<sup>3</sup> d'eau pour 1 kg de phénol). Le mélange est chauffé à 65°C, sous agitation énergétique. L'agitation est poursuivie pendant 30 min à cette même température. Après refroidissement rapide du réacteur au moyen d'un bain de glace, à une température voisine de 25°C, on sépare les phases par centrifugation à 3300 g<sup>+</sup> pendant 30 min sur machine de laboratoire réfrigérée (Jouan type K 63 F de capacité 4 l).

On obtient ainsi 450 cm<sup>3</sup> de phase aqueuse.

La phase phénolique et l'interphase sont à nouveau extraites par 1 l d'eau déminéralisée pendant 30 min à 65°C; après refroidissement et centrifugation comme indiqué ci-dessus, on obtient à nouveau 1470 cm<sup>3</sup> de phase aqueuse.

Les phases aqueuses sont réunies. Le phénol est éliminé par deux lavages successifs au moyen de 2 l de chloroforme à chaque fois. Les phases aqueuses sont ensuite clarifiées par centrifugation pendant 30 min à 3300 g<sup>+</sup>. On obtient ainsi 1800 cm<sup>3</sup> de phase aqueuse.

Cette phase aqueuse clarifiée est alors dialysée pendant 3 d à +4°C contre 3 fois 40 l d'eau déminéralisée. Le rétentat est lyophilisé, on obtient ainsi 14,5 g d'une poudre amorphe blanche.

45 On dissout 8 g de cette poudre dans 400 cm<sup>3</sup> d'un tampon acétate de sodium 0,1M à pH 7 stérile [on dissout 136,09 g d'acétate de sodium pour analyse dans 0,9 l d'eau déminéralisée, puis ajuste le pH à 7,0 par addition d'acide acétique (d = 1,049) et complète à 1 l; la stérilisation est effectuée par chauffage pendant 45 min à 122°C; cette solution est diluée au 1/10 avec de l'eau déminéralisée stérile juste au moment de l'emploi].

La solution obtenue est versée sur une colonne de Sepharose CL 4B<sup>®</sup> (diamètre: 13,5 cm, hauteur: 65 cm) installée en chambre froide (+4°C) et montée en tampon acétate de sodium 0,1M à pH 7,0 stérile. L'élution est effectuée avec le même tampon au débit de 1,33 l/h en enregistrant en continu l'absorbance à 230 nm sous 0,1 cm de l'éluat.

On recueille d'abord une fraction de 3,13 l qui est éliminée. La fraction suivante (1,22 l), qui correspond à un pic d'absorbance à 230 nm, est introduite dans un tube de cellulose régénérée Nojax<sup>®</sup> et est dialysée à +4°C pendant 3 d contre 3 fois 40 l d'eau déminéralisée, puis le rétentat (1300 cm<sup>3</sup>) est lyophilisé. Le solide obtenu est repris dans 93 cm<sup>3</sup> d'eau déminéralisée et la solution est dialysée, avec la même membrane que ci-dessus, pendant 48 h à +4°C contre 65 2 fois 20 l d'eau déminéralisée. Le rétentat est lyophilisé.

On obtient ainsi 1,3 g de substance 41200 RP dont les caractéristiques sont les suivantes:

- aspect: poudre amorphe blanche

- spectre UV: ce spectre est représenté par la fig. 1
- spectre infrarouge (déterminé à partir de comprimés en mélange avec KBr): ce spectre est représenté par la fig. 2 sur laquelle on a porté, en abscisses, d'une part, les longueurs d'onde exprimées en microns (échelle supérieure) et, d'autre part, les nombres d'ondes en  $\text{cm}^{-1}$  (échelle inférieure), et en ordonnées le pourcentage de transmission.

Dans le tableau suivant sont indiquées les principales bandes d'absorption infrarouge de la substance 41200 RP exprimées en nombre d'ondes ( $\text{cm}^{-1}$ ):

3420 tF (dont  $\text{H}_2\text{O}$ ), 3280 ép, 3090 ép, 2970 ép, 2950 ép, 2920 F, 2845 m, 2680 ép, 2100 tF, 1730 ép, 1645 tF, 1545 F, 1460 ép, 1440 ép, 1405 ép, 1375 F, 1335 ép, 1310 m, 1230 m, 1210 ép, 1160 F, 1115 F, 1060 tF, 1025 ép, 945 m, 900 f, 875 f, 800 m, 775 f, 720 ép, 630 ép, 560 F (dont  $\text{H}_2\text{O}$ ), 520 ép, 480 ép, 450 ép, 400 ép, 365 ép.

tF = très forte                      f = faible  
F = forte                              tf = très faible  
m = moyenne                      ép = épaulement

- *Composition*: eau (Fischer) % = 3,8
- sur sec: — acides aminés % = 12,3 (dont 7% d'alanine)
- glucose % = 11,95
- acides nucléiques % = inférieur à 1,3 d'après le spectre UV
- sucres aminés % = 16,3

#### — Analyse élémentaire:

C % = 45,58, H % = 7,47, N % = 4,85, O % = 37, P % = 1,17, Cl % = 0,25, Na % = 2,36, Ca % = 1,33, S % inférieur à 0,5

#### — Electrophorèse:

Dans un gel à 1% d'agarose avec tampon barbital à pH 8,6 et sous une tension de 6 V/cm, le 41200 RP migre vers l'anode à la vitesse de 11 mm/h environ. (Le produit est mis en évidence par le réactif de Schiff après oxydation périodique ou par le noir Soudan B.)

#### Exemple 2:

On opère comme dans l'exemple 1 A. Après 16 h de culture, le moût est refroidi à  $+4^\circ\text{C}$  et son pH est ajusté à 3 par addition d'acide chlorhydrique. Les cellules sont isolées par centrifugation à 4000 tr/min. Le gâteau cellulaire acide est alors chauffé en autoclave pendant 45 min à  $122^\circ\text{C}$ . Après refroidissement, les cellules sont lavées par l'éthanol puis séchées.

En opérant ensuite comme dans l'exemple 1 B et 1 C, et en utilisant les mêmes quantités, on obtient 0,55 g de substance 41200 RP sous la forme d'une poudre amorphe blanche dont les caractéristiques sont les suivantes:

- *Composition*: eau (Fischer) % = 6
- sur sec: — acides aminés % = 17,7 (dont 7,2% d'alanine)
- glucose % = 10,5
- acides nucléiques % = inférieur à 3
- sucres aminés % = 15,2

#### — Analyse élémentaire:

C % = 46,90, H % = 7,32, N % = 5,38, O % = 35, P % = 1,08, Cl % = 0,18, Na % = 2,26, Ca % = 1,83, S % inférieur à 0,5

Le spectre infrarouge de ce produit est identique à celui de la substance 41200 RP obtenue à l'exemple 1.

La présente invention concerne également les médicaments constitués par le produit selon la présente invention et les compositions pharmaceutiques qui le contiennent en association avec un ou plusieurs diluants ou adjuvants compatibles et pharmaceutiques acceptables et éventuellement avec au moins un autre produit thérapeutiquement actif tel qu'un antibiotique.

De préférence, ces compositions sont utilisées par voie parentérale ou intranasale.

Les compositions selon l'invention pour administration parentérale peuvent être des solutions stériles aqueuses, des suspensions ou des émulsions. Comme véhicule dans ces derniers cas, on peut employer le propylène glycol, un polyéthylène glycol, des huiles végétales, en particulier l'huile d'olive, et des esters organiques injectables, par exemple l'oléate d'éthyle. Ces compositions peuvent contenir également des adjuvants, en particulier des agents mouillants, émulsifiants et dispersants. La stérilisation peut se faire de plusieurs façons, par exemple en incorporant à la composition des agents stérilisants. Elles peuvent également être préparées sous forme de compositions solides rendues stériles par irradiation (rayons  $\beta$ ), qui peuvent être dissoutes dans de l'eau stérile ou dispersées dans tout autre milieu stérile injectable, éventuellement au moment de l'emploi.

Les compositions pour administration intranasale peuvent être des solutions stériles aqueuses, des suspensions ou des émulsions qui peuvent éventuellement être associées à un agent propulseur compatible.

Les compositions selon l'invention sont particulièrement utiles en thérapeutique humaine ou vétérinaire pour le traitement immunologique (immunothérapie) des cancers, éventuellement en association avec une chimiothérapie anticancéreuse appropriée ou au cours de rémissions induites par cette dernière.

Les compositions peuvent être également utilisées pour augmenter la résistance aux infections virales, bactériennes, fongiques ou parasitaires, stimuler les défenses naturelles de l'organisme agissant spécifiquement sur ces infections, renforcer, par administration intranasale, les barrières naturelles contre les infections respiratoires ou exercer un pouvoir adjuvant sur l'immunisation spécifique lors de l'administration concomitante d'un vaccin bactérien, viral ou parasitaire.

Ces compositions permettent aussi de restaurer les réponses immunologiques adéquates chez des sujets présentant des états d'immunodéficiences congénitales ou consécutives à la sénescence ou à des traitements immunosuppresseurs.

En thérapeutique humaine, les doses dépendent de l'effet recherché et de la durée du traitement: elles sont généralement comprises entre 0,1 et 10 mg/d pour un adulte par voie parentérale.

L'exemple suivant, donné à titre non limitatif, illustre une composition selon l'invention.

#### Exemple:

On prépare une solution contenant 5 g de la substance 41200 RP sous forme salifiée, préalablement stérilisée par irradiation au moyen des rayons  $\beta$ , dans 100  $\text{cm}^3$  de soluté injectable stérile. Cette solution est répartie aseptiquement en ampoules de 5  $\text{cm}^3$  à raison de 2  $\text{cm}^3$  par ampoule. Ces ampoules sont scellées. Elles contiennent chacune 100 mg de principe actif.

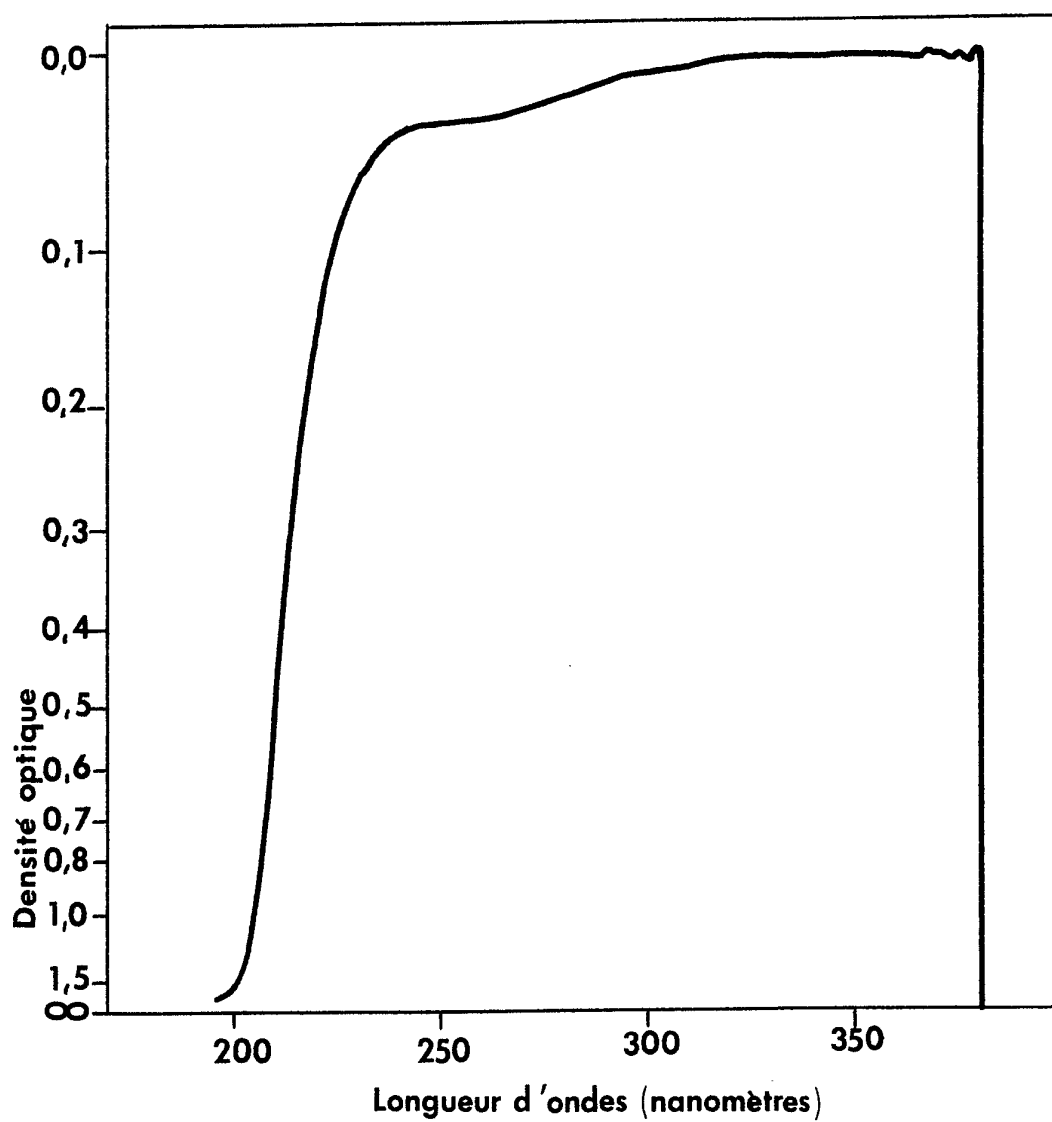
**FIG.1**

FIG. 2

