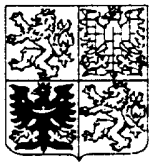
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:
282 924

(19)
ČESKÁ REPUBLIKA



ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2064-93**
(22) Přihlášeno: **03. 02. 93**
(30) Právo přednosti:
14. 02. 92 CH 92/450
(40) Zveřejněno: **13. 04. 94**
(Věstník č. 4/94)
(47) Uděleno: **23. 09. 97**
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **12. 11. 97**
(Věstník č. 11/97)
(86) PCT číslo: **PCT/CH93/00029**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 93/16190**

(13) Druh dokumentu: **B6**
(51) Int. Cl.[6]:
C 12 P 21/00
A 61 K 35/74

(73) Majitel patentu:
LABORATOIRES OM S.A., Meyrin, CH;

(72) Původce vynálezu:
Bauer Jacques, Saint-Sulpice, CH;
Hirt Pierre, Préverenges, CH;
Schulthess Adrian, Begnins, CH;

(74) Zástupce:
Všetečka Miloš JUDr. advokát, Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název vynálezu:
Extrakt bakteriálních makromolekul na bázi modifikovaných bakteriálních proteinů, způsob jeho přípravy a farmaceutický prostředek tento extrakt obsahující

(57) Anotace:
Extrakt na bázi modifikovaných bakteriálních proteinů obsahuje směs bakteriálních polyaniontů s molekulovou hmotností 10 000 až 1 000 000 a izoelektrickým bodem 2,5 až 5,5, v níž celková hmotnost stavebních aminokyselin tvoří alespoň 50 % extraktu. Příprava extraktu spočívá v kultivaci bakterií ve vodném prostředí, pak alkalické extrakci suspenze bakterií a čištění bílkovinného extraktu. Alkalická extrakce se provádí v přítomnosti zředěného vodného zdroje iontů OH^- a při stabilním pH mezi 11 a 13, přičemž pokles pH během extrakce není vyšší než 0,4. Takto získaný bílkovinný extrat je možno použít jako účinnou složku farmaceutického prostředku.

CZ 282 924 B6

Extrakt bakteriálních makromolekul na bázi modifikovaných bakteriálních proteinů, způsob jeho přípravy a farmaceutický prostředek tento extrakt obsahující

Oblast techniky

Vynález se týká extraktu bakteriálních makromolekul na bázi modifikovaných bakteriálních proteinů, způsobu jeho přípravy a farmaceutického prostředku, který uvedený extrakt obsahuje jako účinnou látku.

Dosavadní stav techniky

Jsou známy bakteriální produkty s terapeutickou účinností, které se získávají alkalickou hydrolýzou. Například v patentovém dokumentu CH 633 188 se popisuje koncentrát bakteriálního lyzátu s antiinfekčními vlastnostmi. Lyzáty jednotlivých bakteriálních kmenů se získávají progresivní alkalickou hydrolýzou (při hodnotě pH 9 až 10), která vede k destrukci viditelné bakteriální struktury.

Podstata vynálezu

V rámci vynálezu bylo nyní nově zjištěno, že je možné získat bakteriální extrakty s různými imunofarmakologickými účinky, například s výrazným imunomodulačním účinkem, specifickým alkalickým zpracováním, které umožňuje ponechat viditelnou bakteriální strukturu zpracovaných bakterií neporušenou. Toto zpracování spočívá v alkalické extrakci za podmínek vyššího a zejména stabilního pH.

Předmětem vynálezu je extrakt bakteriálních makromolekul na bázi modifikovaných bakteriálních proteinů, jehož podstata spočívá v tom, že sestává ze směsi kyselých bakteriálních polyaniontů o molekulové hmotnosti 10 000 až 1 000 000 a s izoelektrickým bodem v rozmezí 2,5 až 5,5, v němž celková hmotnost stavebních aminokyselin představuje alespoň 50 % hmotnosti extraktu.

Výhodně celková hmotnost aminokyselin činí 55 až 85 % a obsah liposacharidů je nižší než 2.10^{-3} %, přičemž extrakt dále obsahuje nejvýše 2 % volných aminokyselin, nejvýše 8 % glycidů, nejvýše 4 % aminocukrů a nejvýše 15 % kyseliny desoxyribonukleové.

Výhodně extrakt zahrnuje, racemizované aminokyseliny kterými jsou alespoň serin s 25 až 45 % konfigurace D, kyselina asparagová s 10 až 30 % a arginin s 3 až 20 %.

Předmětem vynálezu je rovněž způsob přípravy výše uvedeného extraktu, jehož podstata spočívá v kultivaci bakterií v kapalném kultivačním prostředí, v suspendování těchto bakterií ve vodném prostředí, v alkalické extrakci této suspenze bakterií a v čistění získaného bílkovinového extraktu, přičemž alkalická extrakce se provádí v přítomnosti zředěného vodného zdroje iontů OH^- a při stabilním pH v rozmezí 11 až 13, přičemž pokles hodnoty pH v průběhu extrakce není vyšší než 0,4.

Výhodně se ke kultivaci použijí bakterie Escherichia coli, například kmen I-1147, uložený u Pasteurova institutu, zdrojem iontů OH^- je roztok hydroxidu sodného o koncentraci 0,01 až 1 %, pH je v rozmezí 12,0 až 12,5, teplota se během extrakce udržuje mezi 30 a 45 °C a doba extrakce se pohybuje od řádově hodin do jednoho týdne.

Výhodně se bílkovinný extrakt, získaný alkalickou extrakcí, podrobí čištění, zahrnujícímu alespoň jednostupňovou ultrafiltraci, zpracování neionogenním detergentem, chromatografii nebo/a sterilní filtraci a lyofilizaci.

Předmětem vynálezu je také farmaceutický prostředek s imunomodulačními vlastnostmi, jehož podstata spočívá v tom, že jako účinnou složku obsahuje terapeuticky přijatelné množství výše uvedeného extraktu bakteriálních makromolekul na bázi modifikovaných bakteriálních proteinů.

Předmětem vynálezu je konečně farmaceutický prostředek pro léčbu rakoviny, jehož podstata spočívá v tom, že jako účinnou složku obsahuje terapeuticky účinné množství výše uvedeného extraktu bakteriálních makromolekul na bázi modifikovaných bakteriálních proteinů.

Použití termínu "modifikované proteiny" je mimo jiné spojeno s přítomností aminokyselin v konfiguraci D v bílkovinném extraktu podle vynálezu, neboť konfigurace L je přítomna v přírodních proteinech.

V podstatě je možné jako výchozí produkt způsobu podle vynálezu použít jakýkoliv grampozitivní nebo gramnegativní bakteriální kmen, jakým je kmen Escherichia coli nebo některý z kmenů, popsaných v již zmíněném patentovém dokumentu CH 633 188. Tak například dále popsané příkladné provedení způsobu podle vynálezu se provádí za použití kmene Escherichia coli I-1147, který je uložen v rámci Budapešťské smlouvy v Národní sbírce mikroorganismů v Pasteurově ústavu v Paříži.

Příklady provedení vynálezu

A. Předběžné stupně

Primární inokulum se připraví ze zmrazených bakterií, které se oživí střídavou kultivací v kapalném prostředí, na bázi sójové živné půdy, a na pevné kultivační půdě. Objem kultivačního inokula se postupně zvyšuje až na 1 litr, přičemž se k inokulaci používá běžné kapalné kultivační prostředí a inkubace se provádí za třepání při teplotě 37 °C.

Takto připravené sekundární inokulum se zavede do fermentoru, majícího objem 20 l a obsahujícího 5 l vhodného běžného živného média. Hodnota pH se nastaví a udržuje na 7,0, například 5 % amoniakem, a teplota se reguluje na 37 °C. Kultivace bakterií se provádí za provzdušňování (vzduch) a míchání, za kontrolovaných podmínek, vedoucích k získání pO_2 vyššího než 90 % nasycení. Provede se měření optické hustoty při 700 nm. Na konci kultivace se bakterie inaktivují teplem autoklávováním (30 min při 120 °C) nebo mžikovou pasterizací (90 s při 105 °C) a odebere se vzorek k ověření absence životaschopných zárodků.

Bakteriální suspenze se zahustí a nespotřebované zbytky kultivačního prostředí se odstraní odstředěním nebo výhodně tangenciální ultrafiltrací, například ultrafiltračním systémem "FILTRON" na polysulfonových patronách. Tato ultrafiltrace se provádí ve dvou stupních; nejprve se provede 5 až 10násobná koncentrace (membrány 30 kD až 0,3 μm) a pak promývání diafiltrací fyziologickým roztokem (3 až 15 promývacích objemů).

Stanoví se sušina bakteriální suspenze, což umožňuje adjustovat biomasu přípravku před alkalickou extrakcí. Konečná suspenze bakterií se zředí fyziologickým roztokem a konečná sušina bakterií se upraví na 2 až 20 g/l.

B. Alkalická extrakce

Pro vlastní alkalickou extrakci se koncentrace NaOH v bakteriální suspenzi upraví na 0,01 až 1 %, zde na 0,1 %.

Extrakce se provádí za míchání mezi 30 a 45 °C, zde při asi 37 °C. V průběhu doby se odebírají vzorky pro analytické účely. Analýza zahrnuje měření pH, stanovení proteinů a lipopolysacharidů. Bakterie, použité k získání dávek I a II, byly zahuštěny a promyty (stupeň A) na patroně 30 kD a v případě dávky III na patroně 1000 kD. V těchto příkladech byla doba trvání procesu alkalické extrakce mírně kratší než dva dny. Výsledky, vztahující se ke třem dávkám (I, II a III), získaným z uvedeného kmene Escherichia coli, jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1. Monitorování alkalické extrakce

Dávka	sušina (g/l)	doba	pH	proteiny* (mg/l)	LPS** (mg/l)
I	7,4	0 min	7,0	220	>100
		5 min	12,3	910	100
		22 h	12,3	1530	8,0
		46 h	12,3	1850	1,0
II	7,4	0 min	7,0	250	>100
		5 min	12,4	870	100
		22 h	12,4	1580	10
		46 h	12,3	1990	3,3
III	7,0	0 min	7,0	60	>100
		5 min	12,4	710	100
		22 h	12,4	1260	10
		46 h	12,4	1640	1,0

* stanovení proteinů Bradfordovou metodou,
reference: hovězí sérový albumin (BSA),

** stanovení LPS metodou LAL,
reference: LPS Escherichia coli 0111:B4.

Toto monitorování dále umožňuje odborníkovi stanovit přibližnou dobu procesu alkalické extrakce v závislosti na zamýšleném použití s ohledem na typ použitých bakterií a podmínky pH a teploty. Tato doba se obecně pohybuje mezi několika hodinami a asi jedním týdnem.

Pokud se týká pH, je nutno připomenout, že jedna z charakteristik vynálezu spočívá ve stabilním pH, které se udržuje mezi 11 a 13, například mezi 12,0 a 12,5, s poklesem v průběhu extrakčního procesu nanejvýš 0,4. V tomto příkladu bylo pH 12,3 až 12,4 s maximální výchylkou v průběhu extrakce 0,1.

Další významná výhoda způsobu podle vynálezu je zřejmá z výsledků, uvedených v tabulce 1. Je možno konstatovat, že obsah lipopolysacharidů v získaném bílkovinném extraktu je značně redukován.

Na konci extrakce a před čištěním bílkovinného extraktu se provede mikroskopická kontrola bakterií po zbarvení gram k ověření, že viditelné struktury bakterií jsou neporušené.

C. Čištění bílkovinného extraktu

Bílkovinný extrakt, získaný postupem podle stupně B, se frakcionuje ultrafiltrací; konkrétně se provede 5 až 10násobná koncentrace ultrafiltrací (1000 kD), a účinná složka se extrahuje diafiltrací například s vodou. Nakonec se bílkovinný extrakt zahustí ultrafiltrací (10 kD).

Za účelem eliminace větší části endotoxinů, konkrétně LPS, se bílkovinný extrakt podrobí procesu fázového přenosu s neiongenním detergentem. Tento proces je možno například provést v přítomnosti 7% "Tritonu X-114" zahříváním za míchání po dobu asi 20 min na asi 60 °C. Po oddělení fází se spodní fáze (Triton + LPS) odstraní. Horní vodná fáze, obsahující bílkovinný extrakt, se shromáždí a pH se upraví na 7.

Tato vodná fáze se podrobí iontovýměnné chromatografii k dalšímu snížení obsahu LPS a odstranění neionogenního detergentu. K této chromatografii je možno použít například gel DEAE-Sepharose. Konkrétně se vodná fáze, obsahující bílkovinný extrakt, nejprve adsorbuje na měnič iontů, pak se odstraní molekuly, které nebyly zachyceny, a promytím při nízkém pH se odstraní nečistoty. Po ekvilibraci gelu při neutrálním pH se bílkovinný extrakt eluuje zvyšováním iontové síly a pak se eluát zahustí ultrafiltrací a promyje diafiltrací s vodou. Takto vyčištěný bílkovinný extrakt se sterilně přefiltruje a popřípadě lyofilizuje obvyklým o sobě známým způsobem.

Lyofilizát byl podroben biochemickým analýzám a imunofarmakologickým testům. Stanovení aminokyselin, racemizovaných během alkalické extrakce, bylo provedeno podle Nimury N. a Kinoshity T., J. Chromatography, 352, 169-177, 1986. Různé racemizace, detekované v bílkovinných extraktech (loty I, II a III), jsou jako příklady uvedeny v tabulce 2 a vyjádřeny v % konfigurace D.

Tabulka 2. Racemizované aminokyseliny

parametry:	% konfigurace D		
lot	I	II	III
racemizované aminokyseliny:			
kyselina asparagová	18	18	20
serin	33	35	39
arginin	8	10	12

Neracemizované: alanin, tyrosin, valin, fenylalanin a leucin.

Nedetekovatelné: kyselina glutamová, threonin, prolin, methionin, isoleucin, cystein, lysin, histidin a tryptofan.

Analytické výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3. Složky lyofilizátu

parametry:	% lyofilizátu		
lot	I	II	III
obsah proteinů:			
proteiny (Bradford)	69,2	70,4	63,1
bílkovinné aminokyseliny:			
asparagin a kys. asparagová	7,3	7,3	7,1
glutamin a kys. glutamová	9,6	9,5	8,9
serin	2,6	2,4	2,2
threonin	2,9	3,2	2,3
glycin	3,8	3,9	3,3
alanin	5,9	5,6	5,6
arginin	4,8	4,6	5,3
prolin	2,5	2,4	2,5
valin	4,9	5,0	4,4
methionin	3,1	4,0	3,4
isoleucin	4,1	4,0	3,5
leucin	6,3	6,3	5,9
fenylalanin	3,3	3,3	3,3
cystin	nd	nd	nd
lysin	5,0	4,9	4,7
histidin	1,6	1,9	1,9
tyrosin	3,9	4,0	3,9
celkem	71,7	72,6	68,1
frakce vázané na proteiny:			
mastné kyseliny	0,9	0,9	1,0
glycidy	3,9	3,6	4,7
aminocukry	1,8	1,5	2,8
jiné:			
lipopolysacharidy (LPS)	$6{,}1.10^{-4}$	$8{,}4.10^{-4}$	$2{,}5.10^{-4}$
desoxyribonukleové kys. (DNA)	9,5	6,1	4,5
volné aminokyseliny	nd	nd	nd
voda	4,8	4,9	8 4,8
elementární analýza:			
popel	6,0	7,5	7,2
uhlík	47,1	47,0	46,3
vodík	6,7	6,7	6,6
dusík	13,6	14,0	13,6
síra	1,3	1,4	1,8

nd = nedetekováno

Imunofarmakologické vlastnosti

Bylo jasně demonstrováno, zejména testy in vitro a in vivo na pokusných zvířatech, že bílkovinný extrakt podle vynálezu má imunomodulační vlastnosti a protinádorovou účinnost.

1. Imunologické testy in vitro

Imunologické testy in vitro byly prováděny na makrofágách, derivovaných z kostní dřeně, a na lymfocytech ze sleziny, Peyerových plátů nebo mesenterických ganglií, odebraných myším C57BL/6.

Makrofágové modely: Bílkovinný extrakt stimuluje makrofágy v jejich schopnosti aktivovat oxidační metabolismus glukózy v dráze pentózofosfátů a aktivuje produkci metabolitů dusíku (nitritový test). Sekrece TNF, stejně jako produkce prostaglandinů (PGE_2) u makrofágů je stimulována bílkovinným extraktem.

Nitritový test, uvedený jako příklad, byl proveden podle M. A. Marletty, Biochemistry, 27, 8706-8711, 1988. Makrofágy, odvozené od kostní dřeně, se kultivují na mikroplotnách (70.000 makrofágů na jamku) v přítomnosti různých koncentrací bílkovinného extraktu (0,1 až 50 μg extraktu/ml) nebo lipopolysacharidů E. coli jako pozitivní kontroly (0,0004 až 0,2 μg LPS/ml). Produkce NO_2^- v supernatantech makrofágových kultur se stanoví pomocí Griessova činidla podle J. Mauëla et al., Int. J. Immunopharmac., 11, 637-645, 1989.

Tabulka 4. Výsledky nitritového testu

μg extraktu/ml	nmol NO_2^-/ml	μg LPS/ml	nmol NO_2^-/ml
0	< 0,02	0	< 0,02
0,1	0,9 ± 0,1	0,0004	0,1 ± 0,1
0,39	4,1 ± 0,1	0,0016	0,3 ± 0,1
1,56	7,7 ± 0,2	0,0063	4,2 ± 0,1
6,25	10,8 ± 0,2	0,025	6,5 ± 0,4
25,0	13,1 ± 0,8	0,1	7,1 ± 1,0
50,0	15,1 ± 0,3	0,2	8,3 ± 0,2

Výsledky při různých koncentracích testovaných produktů jsou uvedeny v tabulce 4 v nmol NO_2^-/ml buněčného supernatantu v závislosti na koncentraci extraktu nebo LPS. Bílkovinný extrakt vyvolává silnou produkci NO_2^-.

Lymfocytární modely: Lymfocyty, pocházející ze sleziny, Peyerových plátů nebo mesenterických ganglií, se kultivují na mikroplotnách (5.10^5 buněk na jamku) za standardizovaných kultivačních podmínek v přítomnosti různých koncentrací bílkovinného extraktu (1 až 100 μg extraktu/ml) nebo lipopolysacharidů E. coli jako pozitivní kontroly (1 až 100 LPS μg/ml). Proliferace buněk, vyvolaná produkty, je stanovována mírou inkorporace tritiovaného thymidinu do DNA buněk podle J. Louise et al., Eur. J. Immunol., 9, 841-847, 1979. Amplituda stimulace lymfocytů bílkovinným extraktem je za stejné koncentrace u všech tří zdrojů lymfocytů srovnatelná s pozitivní kontrolou. Bílkovinný extrakt je aktivní od 1 μg extraktu/ml a vykazuje maximum aktivity mezi 30 a 100 μg extraktu/ml.

2. Imunologický test in vivo

Protinádorová účinnost bílkovinného extraktu byla prokázána in vivo na modelu vyvolaného peritoneálního karcinomu u myší BD IX.

Použité buňky: Buňky Pro b byly klonovány z kultury buněk K12, izolovaných z nádoru DHD, vyvolaného dimethylhydrazinem u polorodé myši BD IX, podle F. Martina et al., Int. J. Cancer, 32, 623-627, 1983.

Indukce peritoneálních karcinomů: Buňky Pro b, vstříknuté intraperitoneální cestou syngenním myším (10^6 buněk/myš), vyvolávají po asi deseti dnech četné pevné noduly, které se objevují v epiploonu nebo mesenteriu na úrovni mléčných skvrn (milky spots) a pak progresivně pronikají do peritoneální dutiny, podle P. Lagadaca et al., Invasion and Metastasis, 7, 83-95, 1987. Po dalších 4 až 5 týdnech se objevuje krvácivá vodnatelnost a všechny myši umírají po 8 až 12 týdnech.

Indukce pulmonálních metastáz: Vstříknutí 7.10^6 buněk Pro b do femorální žíly vyvolává pulmonální metastázy, které napadají laloky, a všechny myši umírají po 6 až 10 týdnech.

Léčba peritoneálních a pulmonálních karcinomů: Imunoterapie se zahajuje 14 dní po injekci nádorových buněk, když jsou karcinomy makroskopické. Léčba spočívá v intraperitoneálních injekcích bílkovinného extraktu v množství 10 mg na kg tělesné hmotnosti. Myši dostávají celkem 5 injekcí v odstupu 3 až 5 dní. Každý pokus zahrnuje kontrolní a ošetřovanou skupinu o 10 (nebo 12) myších, které jsou očíslovány.

Výsledky: Myši se usmrtí 6 týdnů po vstříknutí buněk a provede se autopsie. Objem peritoneálních karcinomů se zhodnotí naslepo a myši se seřadí podle vzrůstající velikosti karcinomů. Sestaví se stupnice karcinomatózy podle počtu a velikosti pozorovaných nodulů. Objem hemorrhagických ascitů se měří dvojím vážením. Klasifikace pulmonálních metastáz se provede po mikroskopickém pozorování plic a myši se rozdělí do dvou skupin: s metastázami a bez nich.

Získané výsledky ukazují, že v osmi pokusech na 82 ošetřených myších nevykazovala 41 myš při autopsii žádný nodulus (40 až 60 % myší na pokus); u ostatních myší byl růst nodulů významně inhibován. Kromě toho 78 z 82 myší nevykazovalo ascites. Všechny neošetřené myši měly nádory a hemorrhagické ascity. Tyto výsledky potvrzuje rovněž test přežití: z 10 myší, ošetřených bílkovinným extraktem, přežily 3 myši do 10., 18. a 27. měsíce po injekci rakovinných buněk a při autopsii neměly nádor. Všechny myši z kontrolní skupiny zemřely na nádor 3 měsíce po injekci buněk.

Výsledky, získané během dvou pokusů s růstem pulmonálních metastáz, dále umožnily prokázat, že bílkovinný extrakt má systemický účinek. Z 20 myší, léčených intraperitoneální injekcí, totiž 13 myší vykazuje úplnou inhibici růstu pulmonálních metastáz. Protinádorový účinek bílkovinného extraktu se dosahuje u metastáz, vyvolaných rakovinnými buňkami tračníku a rovněž disociovanými nádory. Během léčby nebyly pozorovány známky toxicity.

3. Akutní toxicita

Bílkovinný extrakt má slabou toxicitu. Jednotkové dávky, dosahující 300 mg na kg, aplikované intraperitoneálně, jsou myšmi dobře tolerovány.

4. Aplikace

Aplikace bílkovinného extraktu se provádí injekčně, výhodně intraperitoneálně, ve formě lyofilizátu, rozpuštěného například ve fyziologickém roztoku. Stejně je možno použít další galenické formy, například aplikované orální, rektální nebo topickou cestou.

Všechna procenta, uváděná v textu, jsou procenty hmotnostními.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Extrakt bakteriálních makromolekul na bázi modifikovaných bakteriálních proteinů, **vyznačený tím**, že sestává ze směsi kyselých bakteriálních polyaniontů o molekulové hmotnosti 10 000 až 1 000 000 a s izoelektrickým bodem v rozmezí 2,5 až 5,5, v němž celková hmotnost stavebních aminokyselin představuje alespoň 50 % hmotnosti extraktu.

2. Extrakt podle nároku 1, **vyznačený tím**, že celková hmotnost aminokyselin činí 55 až 85 % a obsah liposacharidů je nižší než 2.10^{-3} %, přičemž extrakt dále obsahuje nejvýše 2 % volných aminokyselin, nejvýše 8 % glycidů, nejvýše 4 % aminocukrů a nejvýše 15 % kyseliny desoxyribonukleové, přičemž všechna uvedená % jsou hmotnostní.

3. Extrakt podle nároku 1, **vyznačený tím**, že zahrnuje racemizované aminokyseliny, kterými jsou alespoň serin s 25 až 45 % konfigurace D, kyselina asparagová s 10 až 30 % a arginin s 3 až 20 %, přičemž všechna uvedená % jsou hmotnostní.

4. Způsob přípravy extraktu podle nároku 1, **vyznačený tím**, že spočívá v kultivaci bakterií v kapalném kultivačním prostředí, v suspendování těchto bakterií ve vodném prostředí, v alkalické extrakci této suspenze bakterií a v čištění bílkovinného extraktu, přičemž alkalická extrakce se provádí v přítomnosti zředěného vodného zdroje iontů OH^- a při stabilním pH v rozmezí 11 až 13, přičemž pokles hodnoty pH v průběhu extrakce není vyšší než 0,4.

5. Způsob podle nároku 4, **vyznačený tím**, že se ke kultivaci použijí bakterie Escherichia coli, zejména kmen I-1147, uložený u Pasterova institutu, zdrojem iontů OH^- je roztok hydroxidu sodného o koncentraci 0,01 až 1 %, pH je v rozmezí 12,0 až 12,5, teplota se během extrakce udržuje mezi 30 a 45 °C a doba extrakce se pohybuje od řádově hodin do jednoho týdne.

6. Způsob podle nároku 4 nebo 5, **vyznačený tím**, že bílkovinný extrakt, získaný alkalickou extrakcí, se podrobí čištění, zahrnujícímu alespoň jednostupňovou ultrafiltraci, zpracování neionogenním detergentem, chromatografii nebo/a sterilní filtraci a lyofilizaci.

7. Farmaceutický prostředek s imunomodulačními vlastnostmi, **vyznačený tím**, že jako účinnou složku obsahuje terapeuticky přijatelné množství extraktu podle nároků 1 až 3.

8. Farmaceutický prostředek pro léčbu rakoviny, **vyznačený tím**, že jako účinnou složku obsahuje terapeuticky přijatelné množství extraktu podle nároku 1 až 3.

Konec dokumentu