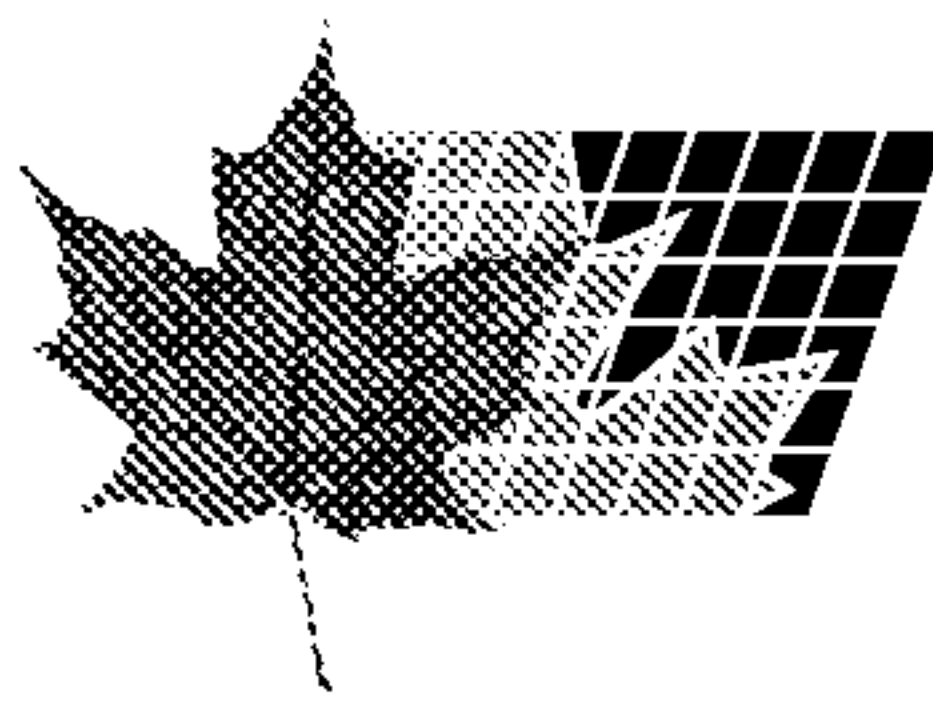




(11) (21) (C) **2,119,149**
(86) 1993/07/20
(87) 1994/02/03
(45) 2001/03/13

(72) Aubert, Lucien, FR

(72) Martin, Richard, FR

(73) L'OREAL, FR

(51) Int.Cl.⁵ C12P 1/04, A61K 35/74, A61K 39/39

(30) 1992/07/20 (92/08932) FR

(54) **MEDICAMENT, NOTAMMENT IMMUNOMODULATEUR,
CONTENANT DES ENVELOPPES OU FRACTIONS
D'ENVELOPPES DE BACTERIES FILAMENTEUSES NON
PHOTOSYNTHETIQUES ET NON FRUCTIFIANTES, ET SA
PREPARATION**

(54) **DRUG, PARTICULARLY AN IMMUNOMODULATOR,
CONTAINING NON-FRUCTIFYING, NON-
PHOTOSYNTHETIC FILAMENTOUS BACTERIA
ENVELOPES OR FRACTIONS THEREOF, AND
PREPARATION THEREOF**

(57) Ce médicament contient en particulier des fractions d'enveloppes de bactéries des genres *Beggiatoa* et *Vitreoscilla*. Applications notamment dans le traitement des infections ORL ou bronchopulmonaires.

(57) A drug containing, in particular, fractions of the envelopes of bacteria of genera *Beggiatoa* and *Vitreoscilla*. The drug is particularly useful for treating ear, nose and throat infections or bronchopulmonary infections.





DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : A61K 35/74, 39/39, C12P 1/04	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/02158 (43) Date de publication internationale: 3 février 1994 (03.02.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00741 (22) Date de dépôt international: 20 juillet 1993 (20.07.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/08932 20 juillet 1992 (20.07.92) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): L'OREAL [FR/FR]; 14, rue Royale, F-75008 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : AUBERT, Lucien [FR/FR]; 6, impasse du Verseau, F-06320 Cap-d'Ail (FR). MARTIN, Richard [FR/FR]; 8, allée du Clos-du-Pin, Roche-Corbon, F-37290 Vouvray (FR).		(74) Mandataire: STALLA-BOURDILLON, Bernard; Nony & Associés, 29, rue Cambacérès, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: DRUG, PARTICULARLY AN IMMUNOMODULATOR, CONTAINING NON-FRUCTIFYING, NON-PHOTOSYNTHETIC FILAMENTOUS BACTERIA ENVELOPES OR FRACTIONS THEREOF, AND PREPARATION THEREOF (54) Titre: MEDICAMENT, NOTAMMENT IMMUNOMODULATEUR, CONTENANT DES ENVELOPPES OU FRACTIONS D'ENVELOPPES DE BACTERIES FILAMENTEUSES NON PHOTOSYNTHETIQUES ET NON FRUCTIFIANTES, ET SA PREPARATION (57) Abstract A drug containing, in particular, fractions of the envelopes of bacteria of genera Beggiatoa and Vitreoscilla. The drug is particularly useful for treating ear, nose and throat infections or bronchopulmonary infections. (57) Abrégé Ce médicament contient en particulier des fractions d'enveloppes de bactéries des genres Beggiatoa et Vitreoscilla. Applications notamment dans le traitement des infections ORL ou bronchopulmonaires.		

Médicament, notamment immunomodulateur, contenant des enveloppes ou fractions d'enveloppes de bactéries filamenteuses non photosynthétiques et non fructifiantes, et sa préparation.

L'invention a pour objet un nouveau médicament contenant comme principe actif des enveloppes ou fraction d'enveloppes de bactéries filamenteuses non photosynthétiques et non fructifiantes, ainsi que sa préparation.

On sait que certains constituants des enveloppes des bactéries Gram négatives, et notamment les fractions lipopolysacharidiques qui peuvent en être extraites, présentent des propriétés de stimulation non spécifique des défenses immunitaires de l'organisme ; voir par exemple Int.Archs Allergy Appl. Immun.76 Suppl.1.119-127, (1985), et Journal of Immunopharmacology 3(2), 119-132 (1981).

On a maintenant découvert que les enveloppes de certaines bactéries appelées, selon la classification du Bergey's Manual, bactéries filamenteuses non photosynthétiques et non fructifiantes, présentent des propriétés immunomodulatrices particulièrement intéressantes. Elles stimulent notamment, de façon non spécifique, les défenses immunitaires, y compris l'immunité cellulaire, et en particulier les macrophages.

L'invention a donc pour objet un médicament ayant notamment un effet immunomodulateur, contenant des enveloppes de bactéries ou des fractions de ces enveloppes, caractérisé par le fait que lesdites bactéries sont choisies parmi les bactéries filamenteuses non photosynthétiques et non fructifiantes telles que définies selon la classification du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, volume 3, section 23, 9e édition 1989.

Plus particulièrement, l'invention a pour objet l'utilisation d'enveloppes de bactéries, ou de fractions desdites enveloppes, comme ingrédient actif dans la préparation d'un médicament destiné à stimuler l'immunité non spécifique, caractérisée par le fait que lesdites bactéries sont choisies parmi les bactéries de l'ordre des Beggiatoales et les bactéries du genre Vitreoscilla.

L'invention a également pour objet un médicament et des compositions pharmaceutiques contenant des enveloppes de bactéries ou des fractions de ces enveloppes, caractérisé par le fait que lesdites bactéries sont choisies parmi les bactéries du genre Vitreoscilla.

On appelle ici "enveloppe" la paroi bactérienne et éventuellement les membranes sous-jacentes.

Parmi les bactéries dont les enveloppes ou fractions d'enveloppes constituent un ingrédient actif du médicament immunomodulateur de l'invention, on citera plus particulièrement les bactéries appartenant à l'ordre des Beggiatoales, et notamment les bactéries appartenant au genre *Beggiatoa*, telles que par exemple diverses souches de *Beggiatoa alba* suivant la définition donnée dans Arch. Microbiol. (1984) 137, 139-144. Il convient de noter que cette définition de *B. alba* correspond aux anciennes appellations *Beggiatoa arachnoidea*, *B. gigantea*, *B. leptomiformis*, *B. minima*, *B. mirabilis* du Bergey's manual, 8e édition.

On peut citer par ailleurs les bactéries appartenant au genre *Vitreoscilla*, dont on sait qu'il est proche et souvent difficilement discernable du genre *Beggiatoa*.

Les bactéries qui viennent d'être définies, et dont plusieurs ont déjà été décrites, ont généralement un habitat aquatique, et peuvent être trouvées notamment dans les sources d'eau thermale.

- 2 -

Parmi les bactéries utilisables, on peut citer par exemple :

- 5 - *Vitreoscilla beggiatoïdes* (ATCC 43181)
 - *Beggiatoa alba* (ATCC 33555).

10 On sait que la culture des bactéries filamenteuses non photosynthétiques et non fructifiantes est relativement difficile, de même que l'obtention de cultures pures. La plupart des auteurs préconisent l'utilisation de milieux mal définis, y compris des macérations diverses utilisant l'eau de ville. La source de carbone recommandée est un acétate.

 On a maintenant découvert qu'il est possible d'adapter ces bactéries, par contre-sélection, à l'utilisation d'un ose, au lieu d'acétate, comme source de carbone.

15 On a découvert en outre qu'il est possible de cultiver ces bactéries sur un milieu de culture parfaitement défini. On peut en particulier effectuer une culture dans le milieu suivant :

TABLEAU 1

COMPOSITION	CONCENTRATION
Extrait autolytique de levures	0,5 à 5 g/l
Peptone	0,5 à 5 g/l
Glucose anhydre	0,5 à 7 g/l
Micro-éléments de Heller	0,5 à 5 ml/l
CaCl ₂ , 10 H ₂ O	0,010 à 0,200 g/l

30 On complète à 1 000 ml par de l'eau distillée. Parmi les peptones utilisables, on peut citer par exemple la peptone papainique de soja.

 Ce milieu particulier se distingue des milieux généralement utilisés par l'absence de catalase et de sulfure.

35 Les micro-éléments de Heller, dont la composition est donnée dans la partie expérimentale ci-après, ont été décrits par Heller, Ann Sci. Nat. Biol. Veg. 14 : 1-223 (1953). Il s'agit de mélanges de divers éléments minéraux qui ont été recommandés par Heller, non pas pour la culture des bactéries, mais pour la nutrition des tissus végétaux cultivés in vitro. Il convient de noter ici que l'on n'a pas cherché à déterminer si les micro-éléments de Heller sont tous indispensables ou utiles dans la culture des bactéries filamenteuses non photosynthétiques

40

et non fructifiantes. Il a cependant été trouvé que les micro-éléments de Heller, utilisés ensemble, par exemple en combinaison avec les autres constituants mentionnés dans le tableau 1 ci-dessus permettent effectivement la culture des bactéries considérées.

La culture peut être effectuée à la température appropriée convenant pour l'espèce bactérienne cultivée. Généralement cette température est comprise entre 18 et 40°C suivant les souches. Le pH du milieu de culture est de préférence compris entre 5,5 et 8.

Grâce au procédé de l'invention, il a été possible d'obtenir, à partir de prélèvements d'eaux thermales, des cultures axéniques, en dépit des difficultés connues d'obtention de cultures pures de bactéries filamenteuses non photosynthétiques et non fructifiantes.

10 L'invention a donc également pour objet un procédé de culture en milieu aqueux de bactéries filamenteuses non photosynthétiques et non fructifiantes, principalement caractérisé par le fait que l'on effectue la culture en utilisant un ose, par exemple le glucose, comme source de carbone principale. On cultive donc ainsi des souches ayant été adaptées et sélectionnées, comme indiqué ci-dessus, pour l'utilisation d'un ose, au lieu d'acétate, comme source principale de carbone. On peut donc effectuer la culture en l'absence d'acétate. Selon d'autres modes de réalisation, on peut en outre opérer en l'absence de H₂S (ou de sulfures) et/ou en l'absence de catalase, alors que ces ingrédients étaient généralement considérés comme indispensables jusqu'à présent. On peut également opérer en présence de micro-éléments de Heller, par exemple dans les proportions indiquées au Tableau 1. On peut utiliser notamment le milieu de culture défini au Tableau 1.

20 L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un médicament tel que défini ci-dessus caractérisé par le fait que l'on cultive lesdites bactéries dans un milieu de culture approprié, puis que l'on sélectionne et cultive les souches capables de se multiplier en utilisant un ose comme source principale de carbone, que l'on sépare la biomasse ou les enveloppes bactériennes, et que l'on extrait éventuellement des fractions desdites enveloppes, notamment des fractions lipopolysaccharidiques, selon les méthodes connues.

Lorsque l'on utilise des souches non encore adaptées, par exemple des souches ou des mélanges de souches provenant de prélèvement d'eaux thermales ou d'eau de mer, on les cultive d'abord dans un milieu de culture classique, contenant de l'acétate (par exemple acétate de sodium) comme seule source de carbone. On sélectionne ensuite les souches capables de se multiplier en utilisant un ose, par exemple le glucose, comme seule source de carbone, en particulier par culture dans le milieu défini qui a été indiqué précédemment. Pour la sélection et l'obtention de cultures pures, on utilise, de façon connue, les méthodes d'ensemencement de 30 milieux de culture solides (gel d'agar) à l'aide de dilutions de milieux de culture liquide, afin d'isoler des colonies issues d'une même cellule bactérienne.

Après culture des bactéries, on peut isoler la biomasse par diverses méthodes

connues, par exemple par filtration, par coagulation avec un alcool (éthanol, isopropanol, isobutanol), par séchage sur cylindre à précouche (amidon, diatomées...) raclée, ou par lyophilisation. Une concentration préalable, par exemple à 80°C sous pression réduite, améliore cette séparation.

On peut procéder à une opération de rupture des enveloppes, par exemple par l'action des ultrasons. On peut en outre préparer des extraits ayant une activité immunostimulante, notamment à l'aide d'un alcool tel que l'éthanol ou le propanol.

On peut également préparer des extraits lipopolysaccharidiques selon les méthodes connues ; voir par exemple Noris et Ribbons, Methods in Microbiology, Vol. 5B, Academic Press (1971). La méthode généralement utilisée est la méthode bien connue dite de Westphal (ou une méthode apparentée), qui consiste à faire l'extraction avec des mélanges phénol-eau à 65°C. On soumet ensuite l'extrait à une dialyse pour éliminer le phénol.

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique caractérisée par le fait qu'elle contient comme principe actif au moins un médicament tel que défini précédemment.

La composition de l'invention contient le principe actif à une concentration suffisante pour permettre l'administration de doses efficaces avec un volume acceptable de composition. Généralement, la composition de l'invention contient de 0,01 à 1 % en poids de principe actif (exprimé par convention en poids de lipopolysaccharide) par rapport au poids total de la composition.

La composition de l'invention contient, outre le principe actif, un excipient approprié permettant son administration par voie entérale, parentérale ou locale.

La composition de l'invention peut être préparée selon les méthodes galéniques usuelles.

Elle peut se présenter notamment sous la forme d'une solution ou suspension dans un véhicule pharmaceutique liquide convenable, y compris un véhicule et un conditionnement permettant l'administration en aérosol. La composition liquide peut être soumise à une lyophilisation, et reconstituée au moment de l'emploi. La composition de l'invention est notamment une composition conditionnée sous la forme de suspension buvables ou injectables, ou pour l'application locale, ou encore sous la forme de compositions conditionnées pour l'application par voie nasale ou conjonctivale.

La composition de l'invention peut être encore présentée par exemple sous la forme de gélules, de comprimés, de poudres, de suppositoires, de pâtes gingivales ou de crèmes.

La composition de l'invention est utilisable notamment comme médicament immunostimulant, chez l'homme ou chez l'animal.

Elle peut être administrée par exemple par voie parentérale (intra-péritonéale,

sous-cutanée, intra-musculaire, intra-veineuse, percutanée) par voie orale, par voie nasale, par
5 voie conjonctivale, par voie rectale ou par voie per-linguale.

Elle peut être aussi utilisée en application locale, par exemple à l'aide de comprimés
à délitement buccal, notamment dans l'immunothérapie non spécifique des maladies de la
cavité buccale.

La posologie usuelle, exprimée par convention en poids de lipopolysaccharide, peut
10 aller par exemple de $1\mu\text{g}$ à $100\mu\text{g/kg}$ de poids corporel et par jour, en une ou plusieurs
administrations, selon l'affection traitée.

Le médicament de l'invention peut être administré à titre prophylactique, dans les
différents cas ci-dessus et en particulier pour la prévention des infections récidivantes de la
sphère otorhinolaryngologique (ORL), et pour la prévention des risques infectieux chez les
15 malades chroniques.

Les formes galéniques permettant l'application sur la peau, par exemple les crèmes,
peuvent être utilisées dans le traitement des brûlures et plaies superficielles. Elles présentent
en outre des propriétés cicatrisantes.

Le médicament de l'invention est administré notamment à titre de traitement
20 immunostimulant, dans le domaine ORL ou bronchopulmonaire ou dans le domaine
dermatologique, dans le cas d'infections bactériennes, fongiques ou virales. Ainsi, lorsque le
médicament est utilisé dans le traitement des infections ORL ou bronchopulmonaires
(rhinopharyngites, laryngites, sinusites, angines, otites, bronchites...), il peut être administré
par voie orale sous forme de comprimés contenant par exemple de 0,05 à 2 mg de principe
25 actif, ou sous forme de composition injectable par exemple sous forme d'ampoule stérile
contenant de 0,01 mg à 0,05 mg de principe actif ou encore sous forme de composition aérosol
contenant par exemple de 1 à 5 mg de principe actif pour 10 ml (et ceci pour 200 doses).
Lorsque le médicament est utilisé dans le traitement des affections dermatologiques comme les
brûlures, les plaies, les ulcères ou les escarres, il est généralement utilisé sous forme de crème
30 ou de gel contenant de 0,01 à 1 % de principe actif.

L'invention a également pour objet l'utilisation de bactéries entières ou
d'enveloppes bactériennes ou de fractions desdites enveloppes (en particulier fractions
lipopolysaccharidiques) dans la préparation d'un médicament immunostimulant ou cicatrisant,
cette utilisation étant caractérisée par le fait que lesdites bactéries sont choisies parmi les
35 bactéries filamenteuses non photosynthétiques et non fructifiantes telles que définies ci-dessus.

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

21 19 14 9

5 **EXEMPLE 1 :Sélection/adaptation d’une bactérie filamenteuse non**
photosynthétique et non fructifiante : activité pharmacologique

 A la suite d’un prélèvement d’eau thermale de la source de Saint-Thomas, Pyrénées
Orientales (France), différentes cultures microbiennes ont été effectuées, en utilisant l’acétate
de sodium comme source de carbone.

10 Ces premières cultures ont été effectuées dans les conditions habituelles de
recherche de microorganismes dans l’eau, la température de culture étant de 26°C.

 A partir de colonies bactériennes isolées par épuisement sur milieu gélosé, on a
procédé à une sélection des bactéries en cultures pures capables de s’adapter à la multiplication
dans un milieu contenant du glucose comme source principale de carbone.

15 On a utilisé le milieu de culture suivant (Tableau 2) :

TABLEAU 2

	COMPOSITION	CONCENTRATION
20	Extrait autolytique de levure Biokar (réf: 112002)	2 g/l
	Peptone papainique de soja (origine PPS-USP Biokar réf.11601)	2 g/l
25	Micro-éléments de Heller	2 ml/l
	Glucose anhydre	2 g/l
	CaCl ₂ , 10 H ₂ O	0,066 g/l
30	Eau distillée	100 ml

 Le pH est ajusté à 7,15 par addition de soude ou potasse 1N avant stérilisation à
121°C pendant 20 min.

35 La composition des micro-éléments de Heller, pour 1l d’eau distillée, est la suivante:

- ZnSO₄,7 H₂O 1g
- MnSO₄,H₂O 0,076 g
- CuSO₄,5H₂O 0,003 g
- KI 0,010 g

40

- 7
- H_3BO_3 1 g
 - $AlCl_3, 6H_2O$ 0,050 g
 - $NiCl_2, 6H_2O$ 0,030 g

On a pu ainsi sélectionner diverses souches de bactéries filamenteuses non photosynthétiques et non fructifiantes. On décrit ci-après les caractéristiques d'une bactérie filamenteuse qui a ainsi été isolée :

- 10
- Filaments (trichomes) de diamètre 2-3 μm contenant des cellules séparées par des septa,
 - production d'hormogonies,
 - couleur blanc beige en culture,
 - bio-masse isolée de couleur rosée,
 - aérobie,
 - Gram négative,
 - n'exigeant pas de catalase,
 - inclusions de poly- β -hydroxy butyrate

Ces caractéristiques ne permettent pas, dans l'état actuel des techniques et de la taxonomie bactérienne, de classer cette souche qui se situe à l'interface des deux genres *Beggiatoa* et *Vitreoscilla*. On sait que ces genres sont très similaires.

Cette souche peut être conservée par congélation directe de la culture en phase exponentielle de croissance, à - 80°C. La souche peut être décongelée par passage dans un bain-marie à 37°C.

Après plusieurs repiquages en milieu solide, la souche adaptée au milieu indiqué ci-dessus a été stabilisée.

20 La culture en milieu liquide glucosé permet d'obtenir des filaments parfaitement distincts alors que la culture en milieu acétate tend à donner des agrégats.

L'optimum de température de culture est entre 26 et 30°C.

L'entretien s'effectue par repiquage à 48 h sur le même milieu liquide, en utilisant 1% du volume total comme inoculum.

Culture en fermenteur

On effectue cette culture dans un fermenteur de 600 l agité (200 tours/min) et aéré.

Le milieu de culture est celui indiqué ci-dessus, avec addition de 0,2 g/l d'un antimousse de type polyméthylsiloxane (Silbion^{*} 97350 RP). La température est régulée entre 26 et 30°C, l'optimum se situant à 29°C.

30 Un cycle complet de croissance s'effectue en 48h environ. Le rendement atteint est de l'ordre de 1,4 g de poids sec par litre.

* (marque de commerce)

L'aération est régulée par un débitmètre massique pour avoir au minimum 20 % d'oxygène dissous.

Il n'y a pratiquement plus de glucose résiduel en fin de croissance.

La biomasse est récoltée par centrifugation.

On opère dans une centrifugeuse de type industriel refroidie à 20°C et capable d'imprimer une accélération supérieure à 5000 x g. La biomasse ainsi obtenue peut être chauffée à 121°C pendant 20 min. Ce traitement casse l'enveloppe cellulaire et libère les lipopolysaccharides. On obtient ainsi un extrait brut directement utilisable que l'on peut, le cas échéant, purifier par la méthode de Westphal précédemment citée.

10 Mise en évidence de l'activité immunorégulatrice sur macrophages humains en culture :

Le principe utilisé est le suivant : lorsqu'une substance immunomodulatrice est introduite dans une culture de macrophages humains, on peut observer une activation du système par la mesure du Ca^{++} libre cytosolique, dont l'élévation correspond à une activation des macrophages. Le taux de calcium cytosolique est mesuré par fluorescence à l'aide de la sonde INDO-1 sous forme d'ester. La sonde pénètre dans les cellules ou elle est transformée sous l'action d'estérases en une forme liant le calcium, la formation d'un complexe avec les ions calcium s'accompagnant d'un déplacement du spectre d'émission.

On utilise une lignée leucémique myélomonocytaire humaine THP1 fournie par le Dr. Matsushima, National Cancer Institute, Fredericks, MD, USA produite dans du milieu RPMI 1640 (GIBCO BRL FRANCE) additionné de 5 % (V/V) de sérum de veau foetal décomplémenté (SIGMA, FRANCE), de glutamine-2mM, de pyruvate de sodium 1mM, de
20 pénicilline 50U/ml et de streptomycine 50U/ml.

Le principe actif étudié, constitué par l'extrait obtenu ci-dessus, est introduit à diverses concentrations et incubé 45 minutes à l'obscurité. Les macrophages (5×10^6 cellules/ml) sont soumis à une incubation de 45min à 37°C à l'obscurité en présence de 4mM de la sonde INDO-1 AM (sous forme d'ester), commercialisée par France Biochem, dans un milieu composé de 140mM NaCl, 5mM KCl, 1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 10mM glucose, 20mM HEPES, de sérum albumine bovine 0,1 %, pH 7,4. Les cellules sont ensuite lavées et remises en suspension à une concentration de 10^6 cellules/ml dans le même milieu.

La fluorescence est mesurée au moyen d'un spectrofluorimètre PERKIN-ELMER LS.5B* à une longueur d'onde d'émission de 410nm pour une longueur d'onde d'excitation de 331nm.

On constate que le principe actif étudié augmente la concentration de Ca^{++}
30 cytosolique, cette augmentation croissant avec la concentration du principe actif qui varie de
* (marque de commerce)

33 à 267 µg/ml.

5 On peut également déterminer l'activation des macrophages par la mesure de la mobilisation des stocks intracellulaire de calcium. Cette estimation se fait après addition de la sonde INDO-1. Le calcium extracellulaire est ensuite chélaté par l'EGTA (1mM). On ajoute ensuite le principe actif étudié, à diverses concentrations. Après stabilisation du signal la concentration de calcium extra-cellulaire est restaurée par l'ajout de CaCl₂ (2mM) dans le milieu d'incubation.

10 On constate que le principe actif étudié, à des concentration de 33 à 267 µg/ml permet la libération des stocks intracellulaires de Ca⁺⁺.

Mesure de la production d'interleukine 1 β

15

On sait que l'on peut provoquer la sécrétion d'IL1β par des lignées monocytaires à l'aide de stimuli variés, notamment les stimuli chimiques à l'aide d'esters de phorbol (PMA)

20 Les cellules THP1 sont incubées en l'absence ou en présence de 1 ou 2 ng/ml de PMA et de concentrations variables du principe actif étudié (variant de 10 à 100 µg/ml), pendant 24H à 37°C. La sécrétion d'IL1β est mesurée dans le surnageant de culture à l'aide d'un essai ELISA, en utilisant des plaques de polypropylène (immulon 2 Dynatech). Des immunoglobulines (IgG) de mouton anti-IL1β sont immobilisées sur les parois des puits. La révélation est effectuée à l'aide de fragments Fab' d'anticorps anti-interleukine 1β, couplés à la peroxydase. La lecture est effectuée par mesure de la densité optique à 492nm, en présence d'orthophénylènediamine, par comparaison avec une courbe standard obtenue à l'aide d'IL1β recombinante.

25

Les résultats sont les suivants (Tableau 3) :

TABLEAU 3

30

	Concentration Principe Actif			
	10 µg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
35 Production IL1 ng/ml	0,2	1,0	15	100
Concentration PMA ng/ml	-	-	1	2

40

21 19 14 9 :

- 10 -

5 En conclusion, le principe actif étudié stimule les flux de Ca^{++} chez les macrophages. L'effet est rapide (moins de 2 secondes) et est dépendant de la dose. Il concerne à la fois l'influx de Ca^{++} et la mobilisation des réserves intracellulaires. De plus, le principe actif étudié stimule la production d'IL1 β après 24H d'incubation, ce qui montre l'absence de toxicité pour les macrophages.

10

Activité cicatrisante :

Cicatrisation épidermique :

15 Sur le cobaye épilé, il est possible d'induire par succion (dépression de 120 mm de mercure pendant deux heures) deux plaies purement épidermiques de taille identique. L'une des plaies peut alors être traitée avec le produit à étudier, l'autre servant de témoin.

Les produits étudiés sont appliqués sous forme de crème contenant 1 % de l'extrait préparé à l'exemple 1, immédiatement après découpe de la bulle de succion (0,5 cm²), sous pansement occlusif, à raison de 10 mg/cm² de plaie.

20

Au bout de 24 heures, des fragments de peau portant les cicatrices sont prélevés. Après séparation du derme et de l'épiderme par l'action du bromure de sodium, la taille de la plaie est mesurée sur l'épiderme séparé, par planimétrie.

L'activité est exprimée en pourcentage de réduction de la surface initiale de la plaie.

25 On a constaté une réduction de 72 % de la surface initiale de la plaie alors que sur la zone témoin la réduction de surface n'est que de 49 % (moyenne de 12 mesures).

Dans une autre expérience on a provoqué une plaie épidermique par incision du coussinet plantaire du cobaye. Les plaies subissent trois traitements, immédiatement après incision puis au bout de 24 heures et 48 heures. Après application, les plaies sont recouvertes d'un pansement occlusif. 24 heures après le dernier traitement, la peau des pattes est prélevée et l'épiderme portant la cicatrisation est séparé du derme par l'action du bromure de sodium. 30 Après rinçage, on mesure la force de rupture de l'épiderme cicatriciel à l'aide d'un extensiomètre de marque INSTRON.

Pour les cicatrices traitées, la force de rupture (moyenne sur 9 animaux par produit) est de $139,8 \pm 23,66$ Newtons, alors que chez les témoins la force de rupture est de $63,2 \pm 6,14$ 35 Newtons.

Cicatrisation dermique chez le rat :

On effectue de manière standardisée des incision concernant toute l'épaisseur de la 40 peau dorsale.

Le produit étudié est appliqué sous forme de crème, comme précédemment, à raison de 10 mg/cm² (quotidiennement) des jours J + 5 à J + 9 après incision, sans pansement.

Comme précédemment on mesure les forces de ruptures de la peau totale cicatricielle excisée à J + 12. Avec le produit étudié à une concentration de 1 %, la force de rupture est de 428,4 Newtons (moyenne sur 9 animaux par produit) tandis que la force de rupture de la zone témoin est de 290,4 Newtons.

EXEMPLE 2 : Composition dermique sous forme de crème

On a préparé une crème ayant la composition suivante :

10 - Extrait bactérien obtenu selon le procédé de préparation de l'exemple 1	0,3 g
- Huile de Vaseline*	20 g
- Acide stéarique	3 g
- Alcool cétylique	3 g
- Stéarate de polyéthylèneglycol à 100 OE	5 g
- Propylèneglycol	3 g
- Conservateur	0,3 g
- Eau purifiée qsp	100 g

Cette crème est appliquée à raison de trois applications par jour pendant 10 à 15 jours sur des brûlures ou des plaies, en vue d'accélérer la cicatrisation.

20 EXEMPLE 3 : Solution injectable

On a préparé une solution injectable sous forme de dose unitaire ayant la composition suivante :

- Extrait bactérien obtenu selon le procédé de préparation de l'exemple 1	0,03 g
- Chlorure de sodium à 0,8 % dans l'eau	1 ml

Cette solution injectable est utilisée dans le traitement des affections ORL ou bronchopulmonaires chroniques. La posologie est de 1 injection sous-cutanée profonde en commençant par une demi-dose puis une dose tous les 15 jours pendant 2 mois.

* (marque de commerce)

REVENDICATIONS

- 1- Utilisation d'enveloppes de bactéries, ou de fractions desdites enveloppes, comme ingrédient actif dans la préparation d'un médicament destiné à stimuler l'immunité non spécifique, caractérisée par le fait que lesdites bactéries sont choisies parmi les bactéries de l'ordre des Beggiatoales et les bactéries du genre Vitreoscilla.
- 10 2- Utilisation selon la revendication 1, caractérisée par le fait que ledit médicament se présente sous forme de solution ou de suspension dans un véhicule approprié, de gélule, de comprimé, de comprimé à délitement buccal, de poudre, de suppositoire, ou de pâte gingivale.
- 3- Utilisation selon la revendication 1, caractérisée par le fait que ledit médicament se présente sous une forme appropriée pour une administration par voie orale, par voie rectale, par voie perlinguale, ou par injection.
- 4- Utilisation selon la revendication 1, caractérisée par le fait que ledit médicament se présente sous une forme appropriée pour une application locale.
- 5- Utilisation selon la revendication 4, caractérisée par le fait que ledit médicament se présente sous une forme appropriée pour une administration par voie nasale, buccale, ou conjonctivale.
- 20 6- Utilisation, selon la revendication 1, d'enveloppes de bactéries, ou de fractions desdites enveloppes, comme ingrédient actif dans la préparation d'un médicament pour la prévention et le traitement d'infections de la sphère otorhinolaryngologique ou broncho-pulmonaires.
- 7- Utilisation selon la revendication 6, caractérisée par le fait que ledit médicament se présente sous la forme d'une composition pour aérosol.
- 8- Utilisation selon la revendication 6, caractérisée par le fait que ledit médicament se présente sous forme de composition injectable.
- 9- Utilisation selon la revendication 6, caractérisée par le fait que ledit médicament se présente sous forme de comprimé.

- 10- Médicament contenant des enveloppes de bactéries ou des fractions de ces enveloppes, caractérisé par le fait que lesdites bactéries sont choisies parmi les bactéries du genre *Vitreoscilla*.
- 11- Médicament selon la revendication 10, caractérisé par le fait qu'il se présente sous la forme d'un extrait alcoolique de la biomasse obtenue après culture desdites bactéries.
- 12- Composition pharmaceutique caractérisée par le fait qu'elle contient comme principe actif, dans un véhicule approprié, au moins un médicament tel que défini dans l'une quelconque des revendications 10 et 11.
- 10 13- Composition selon la revendication 12, caractérisée par le fait qu'elle se présente sous la forme d'une solution ou suspension dans un véhicule pharmaceutique liquide, ou sous la forme de gélule, de comprimé, de poudre, de suppositoire, de pâte gingivale ou de crème.
- 14- Composition selon l'une quelconque des revendications 12 et 13, caractérisée par le fait qu'elle contient un excipient approprié permettant son administration par voie orale, par voie rectale, par voie perlinguale, ou par injection.
- 15- Composition selon l'une quelconque de revendications 12 et 13, caractérisée par le fait qu'elle se présente sous une forme appropriée pour une application locale.
- 16- Composition selon la revendication 15, caractérisée par le fait qu'elle se présente sous une forme appropriée pour une administration par voie cutanée, nasale, buccale, ou conjonctivale.
- 20 17- Composition selon l'une quelconque des revendications 15 et 16, caractérisée par le fait qu'elle contient un excipient approprié permettant son administration sous forme d'aérosol.
- 18- Composition selon l'une quelconque des revendications 12 à 17, caractérisée par le fait qu'elle contient de 0,01 à 1 % en poids dudit principe actif par rapport au poids total de la composition.