



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **93-01371**

(22) Data de depozit: **03.02.1993**

(30) Prioritate: **14.02.1992 CH 450/92;**

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.05.2002 BOPI nr. 5/2002

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. CH 93/00029 03.02.1993

(87) Publicare internațională:
Nr. WO 93/16190 19.08.1993

(56) Documente din stadiul tehnicii:
FR 2396018; 2405298

(71) Solicitant: **LABORATOIRES OM S.A., MEYRIN, CH;**

(73) Titular: **LABORATOIRES OM S.A., MEYRIN, CH;**

(72) Inventatori: **BAUER JACQUES, SAINT-PREX, CH; HIRT PIERRE, PREVERENGES, CH; SCHULTHESS
ADRIAN, BEGNINES, CH;**

(74) Mandatar: **ROMINVENT S.A., BUCUREȘTI;**

(54) **EXTRACT PE BAZĂ DE PROTEINE BACTERIENE, MODIFICATE, ȘI
PROCEDEU PENTRU PREPARAREA ACESTUIA**

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la un extract pe bază de proteine bacteriene, modificate, și la un procedeu pentru prepararea acestuia, folosit ca imunomodulator și antitumoral. Extractul conform invenției este constituit dintr-un amestec de polianioni bacterieni acizi, având o greutate moleculară de 10000... 1000000 și un punct izoelectric de 2,5...5,5 și în care suma ponderală a aminoacizilor constitutivi reprezintă maximum 50% din extract, de preferință 55...85%, maximum $2 \times 10^{-3}\%$ lipopolizaharide, maximum 2% aminoacizi liberi, maximum 8% glucide, maximum 4% aminozaharuri, maximum 15% acid dezoxiribonucleic, aminoacizi racemizați și reziduuri acide cu conținut predominant de acid aspartic și acid glutamic. Procedeu conform

invenției constă în aceea că se efectuează cultivarea de bacterii gram pozitive sau gram negative, de preferință *Escherichia coli* specia I-1147, într-un mediu lichid cunoscut, și suspendarea acestora într-un mediu apos, urmată de extracția alcalină a suspensiei în prezența unei surse apoase, diluate, de ioni OH⁻, de concentrație 0,01...1%, având un pH = 12...12,5, la o temperatură de 30...45°C, într-un interval de câteva ore până la o săptămână, după care extractul obținut se purifică prin trecerea prin una sau mai multe trepte de ultrafiltrare, tratare cu un detergent neionic, cromatografie și/sau filtrare sterilă și, în final, liofilizare.

Revendicări: 3

RO 117621 B1



Invenția se referă la un extract pe bază de proteine bacteriene modificate și la un procedeu pentru prepararea acestuia, folosit ca imunomodulator și antitumoral.

Din brevetul CH 633188, care se referă la un concentrat de lizați bacterieni având proprietăți antiinfecțioase, se cunosc unele produse bacteriene având o activitate terapeutică, care sunt obținute prin hidroliză alcalină. Lizații din fiecare specie bacteriană sunt obținuți printr-o hidroliză alcalină progresivă (pH 9...10), care conduce la distrugerea structurii aparente a bacteriilor.

În acest brevet se arată că s-ar putea obține extracte bacteriene având diferite efecte imunofarmacologice, de exemplu, o activitate imunomodulatoare importantă, prin utilizarea unui tratament alcalin diferit, care permite menținerea intactă a structurii aparente a bacteriilor tratate. În mod specific, acest tratament constă dintr-o extracție alcalină, procedeu care se efectuează în condițiile unui pH ridicat și mai ales stabil.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în stabilirea unui extract pe bază de proteine bacteriene modificate, în rapoarte optime între componentele constitutive, și la stabilirea unui procedeu pentru prepararea acestui extract prin care sunt determinate succesiunea fazelor, timpii și temperatura optime de lucru.

Extractul pe bază de proteine bacteriene modificate, conform invenției, este constituit dintr-un amestec de polianioni bacterieni acizi, având o greutate moleculară de 10000...1000000 și un punct izoelectric de 2,5...5,5, și în care suma ponderală a aminoacizilor constitutivi reprezintă minimum 50% din extract, de preferință 55...85%, maximum 2x10⁻³% lipopolizaharide, maximum 2% aminoacizi liberi, maximum 8% glucide, maximum 4% aminozaharuri, maximum 15% acid dezoxiribonucleic, aminoacizi racemizați și reziduuri acide cu conținut predominant de acid aspartic și acid glutamic.

Aminoacizii racemizați sunt formați din 25...45% serină având configurația D, 10...30% acid aspartic și 3...20% arginină.

Procedeul pentru prepararea unui extract pe bază de proteine modificate, conform invenției, constă în aceea că se efectuează cultivarea de bacterii *gram* pozitive sau *gram* negative, de preferință *Escherichia coli* specia I-1147, într-un mediu lichid cunoscut și suspendarea acestora într-un mediu apos, urmată de extracția alcalină a suspensiei în prezența unei surse apoase diluate de ioni OH⁻, de concentrație 0,01...1% având un pH de 12...12,5, la o temperatură de 30...45°C, într-un timp de câteva ore până la o săptămână, după care extractul obținut se purifică prin trecerea prin una sau mai multe trepte de ultrafiltrare, tratare cu un detergent neionic, cromatografie și/sau filtrare sterilă și, în final, liofilizare.

Avantajele aplicării invenției constau în aceea că, în timpul tratamentului, nu s-a observat nici un semn de toxicitate; extractul proteinic are o toxicitate acută slabă, pentru doze unice de până la 300 mg/kg corp injectate intraperitoneal; extractul proteinic se mai poate administra și pe cale orală, rectală sau topică; un avantaj suplimentar important al procedurii este pus în evidență prin rezultate prin care se constată că, respectiv, conținutul în lipopolizaharide este notabil redus.

Tratamentul chimic al bacteriilor, de exemplu cu ajutorul NaOH diluat, antrenează modificări profunde ale structurilor primare, secundare și terțiare ale proteinelor bacteriene. Astfel, se poate observa dezamidarea parțială a asparaginei și a glutaminei, care conduce respectiv la formarea acidului aspartic și a acidului glutamic. Racemizările parțiale ale mai multor aminoacizi, mai ales ale acidului aspartic, ale serinei și argininei, au de asemenea loc în cursul acestui proces. Ansamblul acestor modificări fizico-chimice ale structurii proteinelor generează polipeptide ale căror proprietăți amfionice sunt acide. Aceste polipeptide posedă toate punctele izoelectrice joase, cuprinse între 2,5 și 5,5, cu o concentrație mai importantă la apropierea de 4,5. Aceste modificări structurale produc astfel extracte proteinice, care prezintă activități imunomodulatoare *in vitro* și *in vivo*.

În extractul proteinic conform invenției, suma în greutate a aminoacizilor constitutivi reprezintă cel puțin 50% (în greutate de liofilizat), de preferință 55 până la 85% din extractul proteinic menționat, și conținutul în lipopolizaharide (LPS) este, de preferință, sub circa $2 \times 10^{-3}\%$. Greutatea moleculară a elementelor constitutive ale extractului proteinic conform invenției este cuprinsă între 10000 și 1000000. Apoi, acest extract proteinic include, în aminoacizii săi proteici, unii aminoacizi cu configurația D și L, și o proporție preponderentă de reziduuri acide, cum ar fi acidul aspartic și acidul glutamic. Aminoacizii racemizați principali sunt serina între 25 și 45% având configurația D, acidul aspartic având o proporție de 10 până la 30% și arginină între 3 și 20%. Utilizarea termenului de "proteine modificate" este legată, între altele, de prezența aminoacizilor având configurația D în extractul proteinic, configurația L fiind prezentă în proteinele native. 55 60

Pe de altă parte, extractul proteinic conform invenției poate include cel mult $2 \times 10^{-3}\%$ lipopolizaharide, cel mult 2% aminoacizi liberi, cel mult 8% glucide, cel mult 4% zaharuri aminate și cel mult 15% acizi dezoxiribonucleici.

În principiu, se pot utiliza orice specii de bacterii *gram (+)* sau *gram (-)*, ca substanțe de plecare pentru procedeul conform invenției, cum ar fi *Escherichia coli* sau una sau mai multe specii bacteriene descrise în brevetul citat mai sus, **CH 633188**. De exemplu, procedeul care este descris mai jos utilizează o specie de *Escherichia coli*, mai exact specia I-1147, depusă conform tratatului de la Budapesta în cadrul Colecției Naționale de Culturi de Micoorganisme, Institut Pasteur, 25 rue de Dr. Roux, 75724, Paris, Cedex 15 - France. 65 70

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției.

A. Etape preliminare

Un inoculum primar este preparat pornind de la bacterii congelate care sunt revitalizate printr-o creștere alternată în mediu lichid, de exemplu "Tryptic Soya Broth", și pe un mediu solid. Volumul culturii de inoculum este mărit progresiv până la 1 l, într-un mediu de cultură lichid obișnuit și incubat la temperatura de 37°C, cu agitare. 75

Inoculumul secundar astfel preparat este introdus într-un fermentator de 20 l, care conține 5 l dintr-un mediu nutritiv obișnuit, adecvat. Valoarea pH-ului este ajustată și menținută la 7,0, de exemplu cu amoniac 5%, și temperatura este reglată la 37°C. Creșterea bacteriană este efectuată sub aerare (aer) și agitare, în condiții controlate, pentru a obține un pO_2 în exces, peste 90%, de saturație. Densitatea optică este măsurată la 700 nm. La sfârșitul culturii, bacteriile sunt inactivate la cald prin autoclavizare, timp de 30 min la 120°C, sau prin pasteurizare instantanee, timp de 90 s la 105°C și se scoate o probă pentru verificarea absenței germenilor revitalizabili. 80

Suspensia bacteriană este concentrată și reziduurile mediului de cultură neconsumate sunt eliminate prin centrifugare sau, de preferință, prin ultrafiltrarea tangențială, de exemplu cu sistemul de ultrafiltrare de tipul "FILTRON" pe cartușe de polisulfonă. Această ultrafiltrare este efectuată în două etape, prima constând dintr-o concentrare de 5 până la 10 ori (membrane de 30 kD până la 0,3 μm), cea de a doua constând dintr-o spălare prin diafiltrare cu soluție sărată fiziologică (3 până la 15 volume de soluție de spălare). 85 90

Reziduul uscat al suspensiei bacteriene se determină, pentru a ajusta biomasa preparării, pentru a o supune apoi unei extracții alcaline. Suspensia finală a bacteriilor este diluată în soluție sărată fiziologică și greutatea finală uscată a bacteriilor este ajustată între 2 și 20 g/l.

B. Extracția alcalină

Pentru extracția alcalină propriu zisă, concentrația în NaOH a suspensiei bacteriene este ajustată între 0,01 și 1%, aici la 0,1%. Extracția este efectuată între 30 și 45°C sub agitare, aici la circa 37°C. Se scot probe în cursul procesului și se efectuează analiza. Această analiză cuprinde măsurarea valorii pH, determinarea proteinelor și a lipopolizaharidelor. 95

100 Bacteriile utilizate pentru obținerea loturilor I și II au fost concentrate și spălate (etapa A) pe
cartuș 30 kD, pe când cele pentru lotul II au fost concentrate și spălate pe cartuș 1000 kD.
În exemplele de față, durata procedurii de extracție alcalină a fost de mai puțin de două
zile. Rezultatele cu privire la cele trei loturi (I, II și III) obținute plecând de la specia
105 *Escherichia coli* menționată mai înainte, sunt cuprinse în tabelul 1.

Tabelul 1

Loturile	Greutatea uscată (g/l)	Durata	pH	Proteine ^x (mg/l)	LPS ^{xx} (mg/l)
110 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
115 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
120 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

^x Dozarea proteinelor conform metodei Bradford

Referință: Albumină serică de bou (BSA)

^{xx} Dozarea LPS conf. Metodei LAL

Referință: LPS de *Escherichia coli* 0111:B4

130 Aceste date permit unui specialist în materie să determine durata adecvată a pro-
cesului de extracție alcalină în funcție de scopul final și ținând seama de tipul de bacterie
utilizată, precum și de condițiile de pH și de temperatură. Această durată este cuprinsă în
general între câteva ore și circa o săptămână.

135 Cu privire la pH, să amintim că una din caracteristicile procedurii, conform invenției,
constă în stabilitatea acestuia, care se menține între 11 și 13, de exemplu între 12,0 și 12,5,
scăderea în timpul procesului de extracție nefiind mai mare decât 0,4. În exemplul de față
pH-ul a fost de 12,3 până la 12,4 cu o variație maximă de 0,1 în cursul extracției.

Un avantaj suplimentar important al procedurii, conform invenției, este pus în
evidență prin rezultatele care figurează în tabelul 1. Se constată că, respectiv, conținutul în
lipopolizaharide din extractul proteinic obținut este notabil redus.

140 La sfârșitul extracției și înainte de purificarea extractului proteinic, se efectuează un
control microscopic al bacteriilor după colorația gram, pentru a se asigura că structurile
aparente ale bacteriilor sunt intacte.

C. Purificarea extractului proteinic

145 Extractul proteinic, obținut prin procesul descris sub (B), este fracționat prin ultra-
filtrare; mai exact, este concentrat de 5 până la 10 ori prin ultrafiltrare (1000 kD), și principiul
activ este extras prin diafiltrare cu apă, de exemplu. Extractul proteinic este în final concen-
trat prin ultra-filtrare (10 kD).

RO 117621 B1

Pentru eliminarea celei mai mari părți a endotoxinelor, mai ales LPS, extractul proteinic este supus unui proces de transfer al fazei cu un detergent neionic. Ca exemplu, acest proces poate fi efectuat în prezența lui "Triton X-114" la 7%, încălzind la circa 60°C sub agitație timp de circa 20 min. După separarea fazelor, se elimină faza inferioară (Triton + LPS). Faza apoasă superioară, conținând extractul proteinic, se recoltează și pH-ul este reglat la 7.

Această fază apoasă este supusă unei cromatografii schimbătoare de ioni, pentru a reduce mai mult conținutul în LPS și pentru a elimina detergentul neionic. Pentru această cromatografie se poate utiliza un gel DEAE-Sepharose, de exemplu. Mai exact, faza apoasă conținând extractul proteinic este mai întâi adsorbită pe schimbătorul de anioni, apoi moleculele care nu au fost reținute se elimină și o soluție de spălare cu pH scăzut elimină impuritățile. După echilibrarea gelului la pH neutru, extractul proteinic este eluat prin creșterea forței ionice, apoi eluatul este concentrat prin ultrafiltrare cu apă. Extractul proteinic astfel purificat este filtrat steril și eventual liofilizat într-un mod cunoscut în sine.

S-au efectuat asupra liofilizatului analize biochimice și teste imunofarmacologice. Determinarea aminoacizilor a fost realizată conform Kinoshita T., *J. Chromatography*, 352, 169-177, 1986. Diferitele racemizări detectate în extractele proteinice (loturile I, II, III), sunt date ca exemple în tabelul 2 și exprimate în procente cu configurația D.

Tabelul 2

Parametrii	% cu configurația D		
Loturile	I	II	III
Aminoacizi racemizați:			
Acid aspartic	18	18	20
Serină	33	35	39
Arginină	8	10	12

Nu au fost racemizate: alanina, tirozina, valina, fenilalanina și leucina.

Nu au fost detectați: acidul glutamic, treonina, prolina, metionina, izoleucina, cisteina, lizina, histidina și triptofanul.

Rezultatele analitice figurează în tabelul 3.

Tabelul 3

Parametrii	% de liofilizat		
Loturile	I	II	III
Conținut în proteine:			
Proteine (Bradford)	69,2	70,4	63,1
Aminoacizi proteici:			
Asparagină & acid aspartic	7,3	7,6	7,1
Glutamină & acid glutamic	9,6	9,5	8,9
Serină	2,6	2,4	2,2

Tabelul 3 (continuare)

Parametrii		% de liofilizat		
Loturile		I	II	III
195	Treonină	2,9	3,2	2,3
	Glicină	3,8	3,9	3,3
	Alanină	5,9	5,6	5,6
	Arginină	4,8	4,6	5,3
	Prolină	2,5	2,4	2,5
200	Valină	4,9	5,0	4,4
	Metionină	3,1	4,0	3,4
	Izoleucină	4,1	4,0	3,5
	Leucină	6,3	6,3	5,9
	Fenilalanină	3,3	3,3	3,3
205	Cistină	ND	ND	ND
	Lizină	5,0	4,9	4,7
	Histidină	1,6	1,9	1,9
	Tirosină	3,9	4,0	3,9
	Total	71,7	72,6	68,1
Fracțiuni legate de proteine:				
210	Acizi grași	0,9	0,9	1,0
	Glucide	3,9	3,6	4,7
	Amino zaharuri	1,8	1,5	2,8
Altele:				
215	Lipopolizaharide (LPS)	$6,1 \times 10^{-4}$	$8,4 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-4}$
	Acizi dezoxiribonucleici (ADN)	9,5	6,1	4,5
	Aminoacizi liberi	ND	ND	ND
	Apă	4,8	4,9	4,8
Analize elementare:				
220	Cenuși	6,0	7,5	7,2
	Carbon	47,1	47,0	46,3
	Hidrogen	6,7	6,7	6,6
	Azot	13,6	14,0	13,6
	Sulf	1,3	1,4	1,8
ND = nedetectat				

Proprietăți imunofarmacologice

225

S-a demonstrat în mod clar, mai ales prin teste *in vitro* și *in vivo*, pe modele de animale, că extractul proteinic conform invenției posedă proprietăți imunomodulatoare și o activitate antitumorală.

1. Teste imunologice in vitro

Testele imunologice *in vitro* au fost realizate pe macrofage derivate din măduva osoasă și pe limfocite provenite de la șobolan, pe plăci Peyer sau pe ganglioni mezenterici, prelevați de la șoareci C57BL/6.

230

Modele macrofage: extractul de proteină stimulează macrofagele în capacitatea lor de a activa metabolismul oxidativ al glucozei pe calea fosfatului de pentoză și activează producția de metaboliți de azot (testul azotiților). Prin extractul proteinic sunt stimulate secreția de TNF, precum și producția prostaglandinelor (PGE_2) la macrofage.

235

Testul nitriților, prezentat ca exemplu, a fost efectuat în conformitate cu Marletta M.A., *Biochemistry*, 27, 8706-8711, 1988. Macrofagele derivate din măduva osoasă sunt cultivate pe microplăci (70000 macrofage pe orificiu) în prezența diferitelor concentrații ale extractului de proteină (0,1 până la 50 μg de extract/ml) sau a lipopolizaharidelor de *E. coli* drept control pozitiv (0,0004 până la 0,2 μg LPS/ml). Producția de NO_2^- în supernatanții culturilor de macrofage este determinată utilizând reactivul lui Griess, conform Mauël J. et al., *Int. J. Immunopharmac*, 11, 637-645, 1989.

240

Rezultatele la diferite concentrații ale produselor testate sunt arătate în tabelul 4 în nmoli de NO_2^- /ml de supernatant celular ca funcție de concentrația extractului sau a LPS. Extractul de proteină induce o producție puternică de NO_2^- .

245

Tabelul 4

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

250

255

Modele limfocitice: limfocite provenind din splină, plăci Peyer sau din ganglioni mezenterici sunt cultivați în microplăci (5×10^5 celule pe orificiu) în condiții de cultură standardizate în prezența unor concentrații diferite ale extractului proteinic (1 până la 100 μg extract/ml) sau a unor lipopolizaharide de *E. coli* drept control pozitiv (1 până la 100 μg LPS/ml). Proliferarea celulară indusă de către produse este determinată prin nivelul de incorporare a timidinei saturate cu tritiu în ADN-ul celulelor, conform Louis J. et al., *Eur. J. Immunol.*, 9, 841-847, 1979. Amplitudinea stimulării limfocitelor prin extractul proteinic este comparabilă, la o concentrație identică, cu cea a controlului pozitiv pentru cele 3 surse de limfocite. Extractul proteinic este activ începând cu 1 μg extract/ml și arată o activitate maximă între 30 și 100 μg extract/ml.

260

265

2. Test imunologic in vivo

270 Activitatea antitumorală a extractului proteinic a fost demonstrată *in vivo* la un model de carcinomatoză peritoneală indusă la șobolani BD IX.

Celulele utilizate: Celulele Pro b au fost clonate plecând de la o cultură de celule K12, fiind izolate dintr-o tumoare DHD indusă prin dimetilhidrazidă la un șobolan BD IX cosanguin, conform Martin F. et al., *J. Cancer*, 32, 623-627, 1983.

275 Inducerea carcinomatozelor peritoneale: Celulele Pro b, injectate pe cale intraperitoneală la șobolani (10^6 celule/șobolan), dau naștere, în zece zile, la numeroși noduli solizi care apar în epiploon sau în mezenteriu, la nivelul petelor lăptoase (milky spots), apoi invadează progresiv cavitatea peritoneală, conform Lagadec P. et al., *Invasion and Metastasis*, 7, 83-95, 1987. La 4...5 săptămâni mai târziu apare o hidroperitonită hemoragică și toți șobolanii mor în 8 până la 12 săptămâni.

280 Inducerea metastazelor pulmonare: injectarea a 7×10^6 celule Pro b în vena femurală provoacă metastaze pulmonare care invadează lobii, și toți șobolanii mor în 6 până la 10 săptămâni.

285 Tratamentul carcinomatozelor peritoneale și pulmonare: imunoterapia începe 14 zile după injectarea celulelor tumorale, când carcinomatozele sunt macroscopice. Tratamentul constă din injectarea intraperitoneală a extractului proteinic în cantitate de 10 mg pe kg greutate a corpului. Șobolanii primesc în total 5 injecții, distanțate la 3 până la 5 zile. Fiecare experiență include o grupă martor și o grupă tratată de 10 (sau 12) șobolani, fiecare fiind numerotat și purtând un număr.

290 Rezultate: Șobolanii sunt sacrificați și li se face autopsie la 6 săptămâni după injectarea celulelor. Volumul carcinomatozelor peritoneale este evaluat orbește și șobolanii sunt clasificați prin ordinul de mărime al carcinomatozei în dezvoltare. Este stabilită o scară a carcinomatozelor după numărul și mărimea nodulilor observați. Volumul hidroperitonitelor hemoragice este măsurat prin cântărire dublă. Clasificarea metastazelor pulmonare a fost efectuată după observația microscopică a plămânilor și șobolanii au fost plasați în două

295 clase: cu sau fără metastaze.

Rezultatele observate arată că în opt experiențe făcute asupra a 82 șobolani tratați, 41 șobolani nu prezintă nici un nodul la autopsie (40 până la 60% din șobolani pentru fiecare experiență); la ceilalți șobolani creșterea nodulilor a fost considerabil inhibată. În plus, 78 sau 82 șobolani netratați nu prezintă deloc hidroperitonite hemoragice. Toți șobolanii netratați au avut tumori și hidroperitonite hemoragice. Aceste rezultate sunt confirmate prin cele obținute într-o experiență de supraviețuire: pornind de la 10 șobolani tratați cu extract proteinic, 3 șobolani au supraviețuit până la 10, 18 și 27 luni după injecția celulelor canceroase și nu au prezentat nici o tumoare la autopsie. Toți șobolanii din grupa martor au murit din cauza tumorilor lor la 3 luni după injecția celulelor.

305 În plus, rezultatele obținute în 2 experiențe asupra creșterii metastazelor pulmonare au permis demonstrarea că extractul proteinic are un efect sistemic. Într-adevăr, la 20 șobolani tratați prin injecție intraperitoneală, 13 șobolani prezintă o inhibiție completă a creșterii metastazelor pulmonare. Efectul antitumoral al extractului proteinic este obținut asupra metastazelor induse de către celulele canceroase ale colonului și, de asemenea, prin tumorile disociate. În timpul tratamentului nu s-a observat nici un semn de toxicitate.

3. Toxicitate acută

Extractul proteinic are o toxicitate slabă. Dozele unice mergând până la 300 mg pe kg, injectate intraperitoneal, sunt bine tolerate de șoareci.

4. Administrarea

315 Administrarea extractului proteinic este efectuată prin injecție, de preferință intraperitoneală, a liofilizatului dizolvat, de exemplu, într-o soluție fiziologică. Se pot lua în considerare și alte forme galenice, de exemplu formele administrabile pe cale orală, rectală sau topică.

1. Extract pe bază de proteine bacteriene modificate, **caracterizat prin aceea că** este constituit dintr-un amestec de polianioni bacterieni acizi având o greutate moleculară de 10000...1000000 și un punct izoelectric de 2,5...5,5 și în care suma ponderală a aminoacizilor constitutivi reprezintă minimum 50% din extract, de preferință de 55...85%, maximum $2 \times 10^{-3}\%$ lipopolizaharide, maximum 2% aminoacizi liberi, maximum 8% glucide, maximum 4% aminozaharuri, maximum 15% acid dezoxiribonucleic, aminoacizi racemizați și reziduuri acide cu conținut predominant de acid aspartic și acid glutamic. 320
2. Extract conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** aminoacizii racemizați sunt formați din 25...45% serină având configurația D, 10...30% acid aspartic și 3...20% arginină. 325
3. Procedu pentru prepararea unui extract pe bază de proteine modificate, definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** se efectuează cultivarea de bacterii *gram* pozitive sau *gram* negative, de preferință *Escherichia coli* specia I-1147, într-un mediu lichid cunoscut, și suspendarea acestora într-un mediu apos, urmată de extracția alcalină a suspensiei în prezența unei surse apoase diluate de ioni OH^- de concentrație 0,01...1% având un pH de 12...12,5, la o temperatură de 30...45°C într-un timp de câteva ore până la o săptămână, după care extractul obținut se purifică prin trecerea prin una sau mai multe trepte de ultrafiltrare, tratare cu un detergent neionic, cromatografie și/sau filtrare sterilă și, în final, liofilizare. 330
- 335

Președintele comisiei de examinare: **ing. Florea Stela**
Examinator: **ing. Teodorescu Daniela**

