PCT ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

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

(51) Classification internationale des brevets 5 : C12P 21/00, A61K 35/74

A1

(11) Numéro de publication internationale: WO 93/16190

(43) Date de publication internationale: 19 août 1993 (19.08.93)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/CH93/00029

(22) Date de dépôt international: 3 février 1993 (03.02.93)

(30) Données relatives à la priorité:
450/92-8 14 février 1992 (14.02.92) CH

(71) Déposant *(pour tous les Etats désignés sauf US):* LABORATORIES OM SA [CH/CH]; 22, rue du Bois-du-Lan, CH-1217 Meyrin 2 (CH).

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants *(US seulement) :* BAUER, Jacques [CH/CH]; 24a, chemin du Pâqueret, CH-1025 Saint-Sulpice (CH). HIRT, Pierre [CH/CH]; 64D, route de Genève, CH-1028 Préverenges (CH). SCHULTHESS, Adrian [CH/CH]; En Loye, CH-1268 Begnins (CH).

(74) Mandataire: MICHELI ET CIE; 122, rue de Genève, Case Postale 61, CH-1226 Thonex (CH).

(81) Etats désignés: BR, CA, CZ, HU, JP, KR, PL, RO, SK, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée
Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: BACTERIAL MACROMOLECULE EXTRACT, METHOD FOR PREPARING SAME AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING SAID EXTRACT

(54) Titre: EXTRAIT DE MACROMOLECULES BACTERIENNES, PROCEDE POUR SA PREPARATION ET COMPOSITION PHARMACEUTIQUE CONTENANT CET EXTRAIT

(57) Abstract

A modified bacterial protein-based extract comprising a mixture of acidic bacterial polyanions having a molecular weight of 10,000-1,000,000 and an isoelectric point of 2.5-5.5, wherein the sum of the constituent amino acids represents at least 50 wt % of said extract. Said protein extract is prepared by cultivating bacteria in an aqueous medium, subjecting the bacterial suspension to alkaline extraction and purifying the protein extract. Alkaline extraction is performed in the presence of a dilute aqueous source of OH^- ions and at a pH of 11-13, with the pH decrease during said extraction being no greater than 0.4. The resulting protein extract may be used as an active ingredient in a pharmaceutical composition.

(57) Abrégé

L'extrait à base de protéines bactériennes modifiées comporte un mélange de polyanions bactériens acides ayant un poids moléculaire de 10'000 à 1'000'000 et un point isoélectrique compris entre 2,5 et 5,5, et dans lequel la somme pondérale des acides aminés constitutifs représente au moins 50 % dudit extrait. La préparation de cet extrait protéinique comporte la culture de bactéries dans un milieu aqueux, puis l'extraction alcaline de cette suspension bactérienne et la purification de l'extrait protéinique. L'extraction alcaline est effectuée en présence d'une source aqueuse diluée de ions OH^- et à un pH stable compris entre 11 et 13, la baisse de ce pH au cours de ladite extraction n'étant pas supérieure à 0,4. L'extrait protéinique ainsi obtenu peut être utilisé comme ingrédient actif dans une composition pharmaceutique.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	**FR**	France	**MR**	Mauritanie
AU	Australie	**GA**	Gabon	**MW**	Malawi
BB	Barbade	**GB**	Royaume-Uni	**NL**	Pays-Bas
BE	Belgique	**GN**	Guinée	**NO**	Norvège
BF	Burkina Faso	**GR**	Grèce	**NZ**	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	**HU**	Hongrie	**PL**	Pologne
BJ	Bénin	**IE**	Irlande	**PT**	Portugal
BR	Brésil	**IT**	Italie	**RO**	Roumanie
CA	Canada	**JP**	Japon	**RU**	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	**KP**	République populaire démocratique de Corée	**SD**	Soudan
CG	Congo			**SE**	Suède
CH	Suisse	**KR**	République de Corée	**SK**	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	**KZ**	Kazakhstan	**SN**	Sénégal
CM	Cameroun	**LI**	Liechtenstein	**SU**	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	**LK**	Sri Lanka	**TD**	Tchad
CZ	République tchèque	**LU**	Luxembourg	**TG**	Togo
DE	Allemagne	**MC**	Monaco	**UA**	Ukraine
DK	Danemark	**MG**	Madagascar	**US**	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	**ML**	Mali	**VN**	Viet Nam
FI	Finlande	**MN**	Mongolie		

EXTRAIT DE MACROMOLECULES BACTERIENNES PROCEDE POUR SA PREPARATION ET COMPOSITION PHARMACEUTIQUE CONTENANT CET EXTRAIT

La présente invention se rapporte à un extrait de macromolécules bactériennes, plus particulièrement à un extrait à base de protéines bactériennes modifiées, à un procédé pour la préparation de celui-ci et à une composition pharmaceutique contenant à titre d'ingrédient actif cet extrait.

On connaît déjà des produits bactériens ayant une activité thérapeutique qui sont obtenus par hydrolyse alcaline. Le brevet CH 633.188 de la même titulaire divulgue par exemple un concentré de lysats bactériens ayant des propriétés anti-infectieuses. Les lysats de chaque souche bactérienne sont obtenus par une hydrolyse alcaline progressive (pH 9-10) qui conduit à la destruction de la structure apparente des bactéries.

Or, les présents inventeurs ont constaté que l'on pouvait obtenir des extraits bactériens ayant divers effets immunopharmacologiques, par exemple une activité immunomodulatrice importante, grâce à un traitement alcalin différent qui permet de maintenir intacte la structure apparente des bactéries traitées. Ce traitement consiste plus particulièrement en une extraction alcaline qui met en oeuvre des conditions de pH élévé et surtout stable.

Ainsi, la présente invention a pour objet d'une part un extrait à base de protéines bactériennes modifiées et d'autre part un procédé pour la préparation de cet extrait protéinique, qui sont définis dans les revendications 1 et 4 respectivement.

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique contenant, à titre d'ingrédient actif, l'extrait à base de protéines bactériennes modifiées selon l'invention (ci-après dénommé: extrait protéinique).

Le traitement chimique de bactéries, par exemple au moyen de NaOH dilué, entraîne de profondes modifications des structures primaires, secondaires et tertiaires des protéines bactériennes. On peut ainsi observer la désamidation

partielle de l'asparagine et de la glutamine, qui conduit respectivement à la formation de l'acide aspartique et de l'acide glutamique. Des racémisations partielles de plusieurs acides aminés, principalement de l'acide aspartique, de la sérine et de l'arginine, ont également lieu au cours de ce processus. L'ensemble de ces modifications physico-chimiques de la structure des protéines génère des polypeptides dont les propriétés amphioniques sont acides. Ces polypeptides possèdent tous de bas points isoélectriques compris entre 2,5 et 5,5, avec une concentration plus importante aux environs de 4,5. Ces changements structurels produisent ainsi des extraits protéiniques qui montrent des activités immunomodulatrices in vitro et in vivo.

Dans l'extrait protéinique selon l'invention, la somme pondérale des acides aminés constitutifs représente au moins 50 % (% poids lyophilisat), de préférence de 55 à 85 % dudit extrait protéinique, et la teneur en lipopolysaccharides (LPS) est de préférence inférieure à environ 2×10^{-3} %. Le poids moléculaire des éléments constitutifs de l'extrait protéinique selon l'invention est compris entre 10'000 et 1'000'000. En outre, cet extrait protéinique comporte parmi les acides aminés protéiniques, certains de configuration D et L, une proportion prépondérante de résidus acides tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique. Les principaux acides aminés racémisés sont la sérine entre 25 et 45 % de configuration D environ, l'acide aspartique entre 10 et 30 % environ et l'arginine entre 3 et 20 % environ. L'emploi de la terminologie "protéines modifiées" est lié, en autre, à la présence d'acides aminés de configuration D dans l'extrait protéinique, la configuration L étant présente dans les protéines natives.

D'autre part l'extrait protéinique selon l'invention peut comporter au plus environ 10^{-3} % de lipopolysaccharides, au plus environ 2 % d'acides aminés libres, au plus environ 8 % de glucides, au plus environ 4 % de sucres aminés et au plus environ 15 % d'acides désoxyribonucléiques.

En principe, n'importe quelle(s) souche(s) de bactérie(s) gram (+) ou gram(-) peut (peuvent) être utilisée(s) comme produit(s) de départ du procédé selon l'invention, comme des Escherichia coli ou l'une ou plusieurs des souches bactériennes décrites dans le brevet précité CH 633.188. A titre d'exemple, le procédé qui est décrit ci-après utilise une souche Escherichia coli, plus particulièrement la souche I-1147, déposée conformément au traité de Budapest le 3 octobre 1991 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Micro-

organismes, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75724 PARIS CEDEX 15 - FRANCE.

Exemple.

A. Etapes préliminaires.

Un inoculum primaire est préparé à partir de bactéries congelées qui sont revivifiées par une croissance alternée en milieu liquide, par exemple "Tryptic Soya Broth", et sur un milieu solide. Le volume de culture de l'inoculum est augmenté progressivement jusqu'à 1 L, dans un milieu de culture liquide usuel, et incubé à 37 °C avec agitation.

L'inoculum secondaire ainsi préparé est introduit dans un fermenteur de 20 L contenant 5 L d'un milieu nutritif usuel approprié. Le pH est ajusté et maintenu à 7,0, par exemple avec de l'ammoniaque 5 %, et la température réglée à 37 °C. La croissance bactérienne est effectuée sous aération (air) et agitation, avec un contrôle des conditions pour obtenir une pO_2 supérieure à 90 % de saturation. Un suivi de la densité optique à 700 nm est effectué. En fin de culture, les bactéries sont inactivées à la chaleur, par autoclavage (30 minutes à 120 °C) ou par flash-pasteurisation (90 secondes à 105 °C), et un prélèvement est effectué pour vérifier l'absence de germes revivifiables.

La suspension bactérienne est concentrée et les résidus de milieu de culture non consommés sont éliminés par centrifugation, ou de préférence par ultrafiltration tangentielle, par exemple avec un système d'ultrafiltration du type "FILTRON" sur des cartouches de polysulfone. Cette ultrafiltration est effectuée en deux étapes, la première consistant en une concentration de 5 à 10 fois (membranes de 30 kD à 0,3 μm), la seconde en un lavage par diafiltration avec du soluté physiologique (3 à 15 volumes de lavage).

Le résidu sec de la suspension bactérienne est déterminé, ce qui permet d'ajuster la biomasse de la préparation pour la soumettre ensuite à l'extraction alcaline. La suspension finale des bactéries est diluée dans du soluté physiologique et le poids sec final des bactéries est ajusté entre 2 et 20 g/L.

B. Extraction alcaline.

Pour l'extraction alcaline proprement dite, la concentration en NaOH de la suspension bactérienne est ajustée entre 0,01 et 1 %, ici à 0,1 %.

L'extraction est effectuée entre 30 et 45 °C sous agitation, ici à environ 37 °C. Des prélèvements sont réalisés et un suivi analytique au cours du temps est effectué. Ce suivi comporte la mesure du pH, le dosage des protéines et des lipopolysaccharides. Les bactéries utilisées pour obtenir les lots I et II ont été concentrées et lavées (étape A) sur cartouche 30 kD, alors que celles pour le lot III l'ont été sur cartouche 1000 kD. Dans les présents exemples, la durée du processus d'extraction alcaline a été d'un peu moins de deux jours. Les résultats, concernant trois lots (I, II et III) obtenus à partir de la souche Escherichia coli précitée, sont mentionnés dans le Tableau 1.

Tableau 1: Suivi de l'extraction alcaline.

Lots	Poids Sec (g/L)	Durée	pH	Protéines* (mg/L)	LPS** (mg/L)
I	7,4	0 minute	7,0	220	>100
		5 minutes	12,3	910	100
		22 heures	12,3	1530	8,0
		46 heures	12,3	1850	1,0
II	7,4	0 minute	7,0	250	>100
		5 minutes	12,4	870	100
		22 heures	12,4	1580	10
		46 heures	12,3	1990	3,3
III	7,0	0 minute	7,0	60	>100
		5 minutes	12,4	710	100
		22 heures	12,4	1260	10
		46 heures	12,4	1640	1,0

* Dosage des protéines selon la méthode Bradford
Référence: Albumine Sérique de Boeuf (BSA)

** Dosage des LPS selon la méthode LAL
Référence: LPS de Escherichia coli 0111:B4

Ce suivi permet en outre à l'homme du métier de déterminer la durée appropriée du processus d'extraction alcaline en fonction du but recherché et en

tenant compte du type de bactéries utilisées ainsi que des conditions de pH et de température. Cette durée est généralement comprise entre quelques heures et une semaine environ.

En ce qui concerne le pH, rappelons qu'une des caractéristiques du procédé selon l'invention consiste en la stabilité de celui-ci, qui se maintient entre 11 et 13, par exemple entre 12,0 et 12,5 avec une baisse au cours du processus d'extraction d'au plus 0,4. Dans le présent exemple, le pH était de 12,3 à 12,4 avec une variation maximale de 0,1 au cours de l'extraction.

Un avantage supplémentaire important du procédé selon l'invention est mis en évidence par les résultats figurant dans le Tableau 1. En effet, on constate que la teneur en lipopolysaccharides dans l'extrait protéinique obtenu est notablement réduite.

A la fin de l'extraction, et avant la purification de l'extrait protéinique, un contrôle microscopique des bactéries après coloration de gram est effectué, afin de s'assurer que les structures apparentes des bactéries sont intactes.

C. Purification de l'extrait protéinique.

L'extrait protéinique, obtenu par le processus décrit sous (B), est fractionné par ultrafiltration; plus particulièrement, il est concentré 5 à 10 fois par ultrafiltration (1000 kD), et le principe actif est extrait par diafiltration avec de l'eau, par exemple. L'extrait protéinique est finalement concentré par ultrafiltration (10 kD).

Afin d'éliminer la majeure partie des endotoxines, plus particulièrement les LPS, l'extrait protéinique est soumis à une procédure de transfert de phase avec un détergent non-ionique. A titre d'exemple, cette procédure peut être effectuée en présence de "Triton X-114" à 7 %, en chauffant à environ 60 °C sous agitation pendant environ 20 minutes. Après séparation des phases, la phase inférieure (Triton + LPS) est éliminée. La phase aqueuse supérieure contenant l'extrait protéinique est récoltée et le pH est ajusté à 7.

Cette phase aqueuse est soumise à une chromatographie échangeuse d'anions pour réduire encore la teneur en LPS et éliminer le détergent non-ionique. On peut utiliser pour cette chromatographie un gel DEAE-Sepharose par exemple. Plus particulièrement, la phase aqueuse contenant l'extrait protéinique est d'abord adsorbée sur l'échangeur d'anions, puis les molécules

non retenues sont éliminées et un lavage à bas pH élimine les impuretés. Après équilibrage du gel à pH neutre, l'extrait protéinique est élué par augmentation de la force ionique, puis l'éluat est concentré par ultrafiltration et lavé par diafiltration avec de l'eau. L'extrait protéinique ainsi purifié est filtré stérilement et éventuellement lyophilisé de manière usuelle connue en soi.

Les analyses biochimiques et les tests immunopharmacologiques ont été effectués sur le lyophilisat. La détermination des acides aminés racémisés lors de l'extraction alcaline a été effectuée selon Nimura N. et Kinoshita T., J. Chromatography, 352, 169-177, 1986. Les différentes racémisations détectées dans les extraits protéiniques (lots I, II et III) sont donnés à titre d'exemple dans le Tableau 2 et exprimés en % de configuration D.

Tableau 2: Acides aminés racémisés.

Paramètres	% configuration D		
Lots	I	II	III
Acides Aminés racémisés:			
Acide Aspartique	18	18	20
Sérine	33	35	39
Arginine	8	10	12

Non racémisés: Alanine, Tyrosine, Valine, Phénylalanine et Leucine.

Non détectable: Acide Glutamique, Thréonine, Proline, Méthionine, Isoleucine, Cystéine, Lysine, Histidine et Tryptophane.

Les résultats analytiques figurent dans le Tableau 3.

Tableau 3: Constituants du lyophilisat.

Paramètres	% Lyophilisat		
Lots	I	II	III
Teneur en protéines:			
Protéines (Bradford)	69,2	70,4	63,1
Acides Aminés Protéiniques:			
Asparagine & Acide Aspartique	7,3	7,6	7,1
Glutamine & Acide Glutamique	9,6	9,5	8,9
Sérine	2,6	2,4	2,2
Thréonine	2,9	3,2	2,3
Glycine	3,8	3,9	3,3
Alanine	5,9	5,6	5,6
Arginine	4,8	4,6	5,3
Proline	2,5	2,4	2,5
Valine	4,9	5,0	4,4
Méthionine	3,1	4,0	3,4
Isoleucine	4,1	4,0	3,5
Leucine	6,3	6,3	5,9
Phénylalanine	3,3	3,3	3,3
Cystine	ND	ND	ND
Lysine	5,0	4,9	4,7
Histidine	1,6	1,9	1,9
Tyrosine	3,9	4,0	3,9
Total	71,7	72,6	68,1
Fractions liées aux protéines:			
Acides gras	0,9	0,9	1,0
Glucides	3,9	3,6	4,7
Sucres aminés	1,8	1,5	2,8
Autres:			
Lipopolysaccharides (LPS)	$6,1x10^{-4}$	$8,4x10^{-4}$	$2,5x10^{-4}$
Acides Déoxyribonucléiques (ADN)	9,5	6,1	4,5
Acides aminés libres	ND	ND	ND
Eau	4,8	4,9	4,8
Analyses élémentaires:			
Cendres	6,0	7,5	7,
Carbone	47,1	47,0	46,3
Hydrogène	6,7	6,7	6,6
Azote	13,6	14,0	13,6
Soufre	1,3	1,4	1,8

ND = Non Détecté

Propriétés immunopharmacologiques

Il a été clairement démontré, notamment par des tests in vitro et in vivo sur des modèles animaux, que l'extrait protéinique selon l'invention, possède des propriétés immunomodulatrices et une activité antitumorale.

1. Tests immunologiques in vitro.

Les tests immunologiques in vitro ont été réalisés sur des macrophages dérivés de moëlle osseuse et sur des lymphocytes provenant de rate, de plaques de Peyer ou de ganglions mésentériques, prélevés sur des souris C57BL/6.

Modèles macrophagiques: L'extrait protéinique stimule les macrophages dans leur capacité d'activer le métabolisme oxydatif du glucose dans la voie des pentoses phosphates et active la production de métabolites de l'azote (test des nitrites). La sécrétion du TNF ainsi que la production des prostaglandines (PGE_2) chez le macrophage sont stimulées par l'extrait protéinique.

Le test des nitrites, présenté à titre d'exemple, a été effectué selon Marletta M. A., Biochemistry, 27, 8706-8711, 1988. Les macrophages dérivés de la moëlle osseuse sont mis en culture en microplaque (70'000 macrophages par puit) en présence de différentes concentrations de l'extrait protéinique (0.1 à 50 µg extrait/mL) ou de lipopolysaccharides de E. coli comme contrôle positif (0.0004 à 0.2 µg LPS/mL). La production de NO_2^- dans les surnageants des cultures de macrophages est déterminée avec le réactif de Griess, selon Mauël J. *et al*, Int. J. Immunopharmac., 11,637-645, 1989.

Tableau 4: Résultats du test des nitrites

µg extrait/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

Les résultats aux différentes concentrations des produits testés sont présentés dans le Tableau 4 en nmol NO_2^-/mL de surnageant cellulaire en fonction de la concentration d'extrait ou de LPS. L'extrait protéinique induit une forte production de NO_2^-.

Modèles lymphocytaires: Des lymphocytes provenant de rate, de plaques de Peyer ou de ganglions mésentériques sont mis en culture dans des microplaques (5×10^5 cellules par puit) dans des conditions de culture standardisées en présence de différentes concentrations de l'extrait protéinique (1 à 100 µg extrait/mL) ou de lipopolysaccharides de E. coli comme contrôle positif (1 à 100 µg LPS/mL). La prolifération cellulaire induite par les produits est déterminée par le taux d'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules, selon Louis J. *et al*, Eur. J. Immunol., 9, 841-847, 1979. L'amplitude de la stimulation des lymphocytes par l'extrait protéinique est comparable, à concentration égale, avec celle du contrôle positif pour les 3 sources de lymphocytes. L'extrait protéinique est actif dès 1 µg extrait/mL et montre un maximum d'activité entre 30 et 100 µg extrait/mL.

2. Test immunologique in vivo.

L'activité antitumorale de l'extrait protéinique a été mise en évidence in vivo dans un modèle de carcinomatose péritonéale induite chez les rats BD IX.

Les cellules utilisées: Les cellules Pro b ont été clonées à partir d'une culture de cellules K12, elles-mêmes isolées d'une tumeur DHD induite par la diméthylhydrazine chez un rat BD IX consanguin, selon: Martin F. *et al*, Int. J. Cancer, 32, 623-627, 1983.

Induction des carcinomatoses péritonéales: Les cellules Pro b, injectées par voie intrapéritonéale aux rats syngéniques (10^6 cellules/rat), donnent naissance en une dizaine de jours à de nombreux nodules solides qui apparaissent dans l'épiploon ou le mésentère au niveau des taches laiteuses (milky spots), puis envahissent progressivement la cavité péritonéale, selon Lagadec P. *et al*, Invasion and Metastasis, 7, 83-95, 1987. Une ascite hémorragique apparaît 4 à 5 semaines plus tard et la totalité des rats meurt en 8 à 12 semaines.

Induction des métastases pulmonaires: L'injection de 7 x 10^6 cellules Pro b dans la veine fémorale provoque des métastases pulmonaires qui envahissent les lobes et tous les rats meurent en 6 à 10 semaines.

Traitement des carcinomatoses péritonéales et pulmonaires: L'immunothérapie commence 14 jours après l'injection des cellules tumorales lorsque les carcinomatoses sont macroscopiques. Le traitement consiste en injections intrapéritonéales de l'extrait protéinique à 10 mg par kg de poids corporel. Les rats reçoivent au total 5 injections, espacées de 3 à 5 jours. Chaque expérience comporte un groupe témoin et un groupe traité de 10 (voire 12) rats, tous numérotés.

Résultats: Les rats sont sacrifiés et autopsiés 6 semaines après l'injection des cellules. Le volume des carcinomatoses péritonéales est évalué en aveugle et les rats sont classés par ordre de carcinomatose croissante. Une échelle des carcinomatoses est établie selon le nombre et la taille des nodules observés. Le volume des ascites hémorragiques est mesuré par double pesée. La classification des métastases pulmonaires a été effectuée après observation microscopique des poumons et les rats ont été placés dans deux classes: avec ou sans métastases.

Les résultats observés montrent que dans huit expériences portant sur 82 rats traités, 41 rats ne présentaient aucun nodule à l'autopsie (40 à 60 % des rats par expérience); chez les autres rats la croissance des nodules était significativement inhibée. De plus, 78 des 82 rats traités ne présentaient pas d'ascites. Tous les rats non traités avaient des tumeurs et des ascites hémorragiques. Ces résultats sont confirmés par ceux obtenus dans une expérience de survie: sur 10 rats traités avec l'extrait protéinique, 3 rats ont survécu jusqu'à 10, 18 et 27 mois après l'injection des cellules cancéreuses et n'ont pas présenté de tumeur à l'autopsie. Tous les rats du groupe témoin sont morts de leurs tumeurs 3 mois après l'injection des cellules.

De plus, les résultats obtenus lors de 2 expériences sur la croissance des métastases pulmonaires ont permis de démontrer que l'extrait protéinique a un effet systémique. En effet, sur 20 rats traités par injection intrapéritonéale, 13 rats présentent une complète inhibition de la croissance des métastases pulmonaires. L'effet antitumoral de l'extrait protéinique est obtenu sur des métastases induites par des cellules cancéreuses du colon et également par les

tumeurs dissociées. Aucun signe de toxicité n'a été observé durant le traitement.

3. Toxicité aigüe

L'extrait protéinique a une faible toxicité. Des doses uniques allant jusqu'à 300 mg par kg, injectées intrapéritonéalement, sont bien tolérées par la souris.

4. Administration

L'administration de l'extrait protéinique est effectuée par injection de préférence intrapéritonéale du lyophilisat dissous dans du soluté physiologique, par exemple. D'autres formes galéniques peuvent également être envisagées, par exemple, des formes administrables par voie orale, rectale ou topique.

REVENDICATIONS

1. Extrait à base de protéines bactériennes modifiées comportant un mélange de polyanions bactériens acides ayant un poids moléculaire de 10'000 à 1'000'000 et un point isoélectrique compris entre 2,5 et 5,5, et dans lequel la somme pondérale des acides aminés constitutifs représente au moins 50 % dudit extrait.

2. Extrait à base de protéines bactériennes modifiées selon la revendication 1, caractérisé par le fait que ladite somme pondérale des acides aminés est comprise entre 55 et 85 %, que la teneur en lipopolysaccharides est inférieure à environ 2×10^{-3} %, par le fait qu'il comporte au plus environ 2 % d'acides aminés libres, au plus environ 8 % de glucides, au plus environ 4 % de sucres aminés et au plus environ 15 % d'acide désoxyribonucléique, et par le fait que parmi les acides aminés protéiniques, dont certains sont racémisés, les résidus acides tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique sont prépondérants.

3. Extrait à base de protéines bactériennes modifiées selon la revendication 1, caractérisé par le fait que les acides aminés racémisés sont au moins la sérine ayant de 25 à 45 % de configuration D, l'acide aspartique de 10 à 30 % et l'arginine de 3 à 20 %.

4. Procédé pour la préparation d'un extrait à base de protéines bactériennes modifiées selon la revendication 1, qui comporte la culture de bactéries en milieu liquide et la suspension de ces bactéries dans un milieu aqueux, puis l'extraction alcaline de cette suspension bactérienne et la purification de l'extrait protéinique, l'extraction alcaline étant effectuée en présence d'une source aqueuse diluée de ions OH^- et à un pH stable compris entre 11 et 13, la baisse de ce pH au cours de ladite extraction n'étant pas supérieure à 0,4.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé par le fait que les bactéries cultivées sont des Escherichia coli, par exemple la souche I-1147 déposée à l'Institut Pasteur, que la source de ions OH^- est du NaOH 0,01 à 1 %, que le pH est compris entre 12,0 et 12,5, et que la température est maintenue entre 30 et 45 °C pendant l'extraction, la durée de celle-ci étant de quelques heures à une semaine.

6. Procédé selon la revendication 4 ou la revendication 5, caractérisé par le fait que l'extrait protéinique obtenu par extraction alcaline est soumis à une

purification, de telle sorte que la teneur en LPS de l'extrait protéinique soit inférieure à 2×10^{-3} %, cette purification comportant une ou plusieurs étapes d'ultrafiltration, de traitement avec un détergent non-ionique, de chromatographie et/ou de filtration stérile, ainsi qu'une lyophilisation.

7. Composition pharmaceutique contenant à titre d'ingrédient actif une quantité thérapeutiquement acceptable de l'extrait à base de protéines bactériennes modifiées selon les revendications 1 à 3.

8. Composition pharmaceutique selon la revendication 7 ayant des propriétés immunomodulatrices.

9. Composition pharmaceutique selon la revendication 7 ayant un effet thérapeutique anti-cancéreux.

10. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisée par le fait qu'elle est préparée sous une forme injectable ou sous une forme administrable par voie orale, rectale ou topique.

Référence du dossier du déposant ou du mandataire JI ph/11168-PCT	Demande internationale PCT/CH 93 / 0002

REC'D 08 FEB 1993
PCT

INDICATIONS RELATIVES A UN MICRO-ORGANISME DEPOSE

(règle 13*bis* du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme visé dans la description
page 2 - 3 , ligne 32 à 35 (page 2) - 1 et 2 (page 3)

B. IDENTIFICATION DU DEPOT D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire ☐

Nom de l'institution de dépôt

COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICRO-ORGANISMES - INSTITUT PASTEUR

Adresse de l'institution de dépôt *(y compris le code postal et le pays)*

25, rue du Dr. Roux
75724 PARIS CEDEX 15
FRANCE

Date du dépôt	n° d'ordre
3 octobre 1991 (03.10.1991)	I-1147

C. INDICATIONS SUPPLEMENTAIRES *(le cas échéant)* Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements ☐

D. ETATS DESIGNES POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNEES
(si les indications ne sont pas données pour tous les Etats désignés)

E. INDICATIONS FOURNIES SEPAREMENT *(le cas échéant)*

Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international *(spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt")*

Réservé à l'office récepteur	Réservé au Bureau international
☒ Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale	☐ Cette feuille est parvenue au Bureau international le :
Fonctionnaire autorisé Müller	Fonctionnaire autorisé

TRAITE DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE
INTERNATIONALE DU DEPOT DES MICRO-ORGANISMES
AUX FINS DE LA PROCEDURE EN MATIERE DE BREVETS

08 FEB 1993
WIPO PCT

FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE :
Madame A. RAMSTEINER
Laboratoires O.M. S.A.
22, Rue du Bois-du-Lan
1217 MEYRIN 2
GENEVE - SUISSE

NOM ET ADRESSE DE LA PARTIE A LAQUELLE LA DECLARATION SUR LA VIABILITE EST DELIVREE

DECLARATION SUR LA VIABILITE, délivrée en vertu de la règle 10.2 par l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE identifiée à la page suivante

I. DEPOSANT	II. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME
Nom : Laboratoires O.M. S.A. Adresse : 22, Rue du Bois-du-Lan 1217 MEYRIN 2 GENEVE - SUISSE	Numéro d'ordre attribué par l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE : I - 1147 Date du dépôt ou du transfert[1] : Le 03 Octobre 1991

III. DECLARATION SUR LA VIABILITE

La viabilité du micro-organisme identifié sous chiffre II a été contrôlée le 03 Octobre 1991 [2]. A cette date, le micro-organisme

[3] [XX] était viable

[3] [ ] n'était plus viable

[1] Indiquer la date du dépôt initial ou, si un nouveau dépôt ou un transfert ont été effectués, la plus récente des dates pertinentes (date du nouveau dépôt ou date du transfert).

[2] Dans les cas visés à la règle 10.2.a)ii) et iii), mentionner le contrôle de viabilité le plus récent.

[3] Cocher la case qui convient.

IV. CONDITIONS DANS LESQUELLES LE CONTROLE DE VIABILITE A ETE EFFECTUE

Conformément aux indications portées sur la fiche de dépôt.
Point III.

IV. AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE

Nom : Collection Nationale de Cultures de Microorganismes

Adresse : Institut Pasteur
25, Rue du Docteur Roux
75724 PARIS CEDEX 15

Signature(s) de la (des) personne(s) compétente(s) pour représenter l'autorité de dépôt internationale ou de l'(des) employé(s) autorisé(s) :

Date : Paris le 16 Octobre 1991

G. WAGENER
Conseiller Scientifique de la C.N.C.M.
pour les souches bactériennes

Y. CERISIER
Directeur Administratif de la C.N.C.M.

TRAITE DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE
INTERNATIONALE DU DEPOT DES MICRO-ORGANISMES
AUX FINS DE LA PROCEDURE EN MATIERE DE BREVETS

FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE :
Madame A. RAMSTEINER
Laboratoires O.M. S.A.
22, Rue du Bois-du-Lan
1217 MEYRIN 2
GENEVE - SUISSE

NOM ET ADRESSE DU DEPOSANT

RECEPISSE EN CAS DE DEPOT INITIAL, délivré en vertu de la règle 7.1 par l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE identifiée au bas de cette page

Idem

I. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME

Référence d'identification donnée par le DEPOSANT :
Escherichia coli 3977

Numéro d'ordre attribué par l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE :
I - 1147

II. DESCRIPTION SCIENTIFIQUE ET/OU DESIGNATION TAXONOMIQUE PROPOSEE

Le micro-organisme identifié sous chiffre I était accompagné :

XXXX d'une description scientifique

XXXX d'une désignation taxonomique proposée

(Cocher ce qui convient)

III. RECEPTION ET ACCEPTATION

La présente autorité de dépôt internationale accepte le micro-organisme identifié sous chiffre I, qu'elle a reçu le 03.10.1991 (date du dépôt initial)[1]

IV. RECEPTION D'UNE REQUETE EN CONVERSION

La présente autorité de dépôt internationale a reçu le micro-organisme identifié sous chiffre I le (date du dépôt initial)
et a reçu une requête en conversion du dépôt initial en dépôt conforme au Traité de Budapest le (date de réception de la requête en conversion)

V. AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE

Nom : Collection Nationale de Cultures de Microorganismes
Institut Pasteur
25, Rue du Docteur ROUX
Adresse : 75724 PARIS CEDEX 15

Signature(s) de la (des) personne(s) compétente(s) pour représenter l'autorité de dépôt internationale ou de l'(des) employé(s) autorisé(s) :

Date : Paris le 03 Octobre 1991
Mme Y. CERISIER
Directeur Administratif de la C.N.C.M.

1 En cas d'application de la règle 6.4.d), cette date est la date à laquelle le statut d'autorité de dépôt internationale a été acquis.

Formule BP/4 (page unique)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CH 93/00029

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.[5] C 12 P 21/00; A 61 K 35/74

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.[5] C 07 K; A 61 K; C 12 P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR, A, 2 405 298 (LABORATOIRES CASSENNE) 4 May 1979	
A	FR, A, 2 396 018 (LABORATOIRES CASSENNE) 26 January 1979	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 May 1993 (18.05.93)	25 May 1993 (25.05.93)
Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office	
Facsimile No	Telephone No

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

CH 9300029
SA 69225

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 18/05/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2405298	04-05-79	None	
FR-A-2396018	26-01-79	None	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No PCT/CH 93/00029

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) [7]

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB 5 C12P21/00; A61K35/74

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée[8]

Système de classification	Symboles de classification
CIB 5	C07K ; A61K ; C12P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté[9]

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS[10]

Catégorie °	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire,[12] des passages pertinents [13]	No. des revendications visées [14]
A	FR,A,2 405 298 (LABORATOIRES CASSENNE) 4 Mai 1979 ---	
A	FR,A,2 396 018 (LABORATOIRES CASSENNE) 26 Janvier 1979 -----	

° Catégories spéciales de documents cités:[11]

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
18 MAI 1993	25 -05- 1993
Administration chargée de la recherche internationale	**Signature du fonctionnaire autorisé**
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	REMPP G.L.E.

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

CH 9300029
SA 69225

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 18/05/93
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A-2405298	04-05-79	Aucun	
FR-A-2396018	26-01-79	Aucun	

EPO FORM P0472