

17 SEP. 1965

P - 29.399

United States Patent
nº 3.185.624



17 SEP

316078

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

PATRÓN DE INTRODUCCIÓN

formulada el 3 de agosto de 1.965, con el nº 316.078

en

ESPAÑA

por DIEZ años

a nombre de TAISHO PHARMACEUTICAL CO., LTD., entidad japonesa, establecida en nº 724, 3-chome, Takataminamicho, Toshima-ku, Tokyo, Japón, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR LÍPIDO A PURIFICADO A PARTIR DE LIPOPOLISACÁRIDOS DERIVADOS DE BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS"

La presente invención se refiere a la preparación de lipido A purificado, derivado de bacterias gram-negativas, particularmente Enterobacteriaceas, por el siguiente método:

5 Los lipopolisacáridos crudos extraídos con fenol acuoso de las células bacterianas cultivadas se hidrolizan con ácido clorhídrico diluido, y se extraen con cloroformo. Las fracciones de lipido A crudo aisladas de los hidrolizados como sustancia soluble en cloroformo, se fraccionan

POOR
QUALITY



5 en una columna de ácido silícico, usando el sistema disolvente cloroformo/metanol. Se separan por destilación la mayor parte de los disolventes de la fracción principal, que contiene lípido A purificado, y se añade acetona a la solución concentrada de lípido A purificado. Los precipitados flocculentos de lípido A purificado se recogen por centrifugación y se secan a vacío.

10 El lípido A es una sustancia que se está observando con gran interés, en vista del hecho de que produce reacciones características tales como efecto antitumor contra los tumores animales, estímulo de la resistencia a las infecciones experimentales, refuerzo de la producción de anticuerpos como coadyuvantes, y alteración de la reactividad a la epinefrina.

15 En la Patente alemana nº 1.073.150 se describe un procedimiento sobre la preparación de lípido A purificado. En este procedimiento, el lípido A crudo se extrae primero con un éster de ácido graso, y el residuo insoluble se disuelve después en disolventes tales como aminas aromáticas terciarias o secundarias, o tetrahidrofurano. Además, se añade a esta solución un exceso de alcohol alifático inferior, separándose después por centrifugación los precipitados resultantes. La solución que sobrenada se concentra hasta un volumen pequeño, bajo vacío, y la solución concentrada final se diluye con agua y se seca por congelación.

20 En la presente invención, el lipopolisacárido crudo se hidroliza durante 0,5 horas en HCl 1 N que contiene 1% en peso de cloruro sódico, a 100°C, y los hidrolizados se extraen con cloroformo. Después de lavar con agua, se añade a los extractos en cloroformo de 5 a 10 volúmenes de ace

30
778

316078



tona, se lavan repetidamente con acetona los precipitados resultantes, y se secan bajo vacío. El lípido A crudo así obtenido se usa como material de partida para posterior purificación.

5 Los resultados de análisis cromatográficos efectuados usando cromatografía en capa delgada indican que la fracción de lípido A crudo no es necesariamente homogénea. Por tanto, un objeto primordial de la presente invención es el perfeccionamiento del método cromatográfico, con el fin de asegurar un cierto rendimiento de lípido A purificado. Este objeto se consigue, según la presente invención, por la siguiente combinación específica: uso de ácido silícico como adsorbente y uso de mezcla cloroformo/metanol (6:4) como eluyente. Así se aseguran la resolución y separación cromatográficas óptimas de impurezas tales como ácidos grasos, aminoácidos y proteínas libres.

10 Los rendimientos de lípido A purificado, por el método de la presente invención, son de aproximadamente 60 a 70% en peso, lo que es mejor que los de los métodos conocidos antes descritos.

15 Propiedades del lípido A purificado obtenido por el método según la presente invención:

1. Propiedades fisicoquímicas

25 Las fracciones de lípido A purificado son un polvo blanco, insoluble en agua, acetona, etanol y metanol, solubles en éter y éter de petróleo, y fácilmente solubles en cloroformo y piridina. Estas fracciones funden a aproximadamente 175-180°C, con descomposición.

30 Los resultados de análisis químicos son los siguientes (siendo los tantos por ciento en peso): H, 1,9 a 2,1%;



P, 2,1 a 2,5%; glucosaminas, 17 a 20%; ácidos grasos, 60 a 70%; estando el resto constituido por ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, y ácidos no identificados.

5 El esquema de absorción infrarroja del lípido A purificado se caracteriza por unos picos de absorción en las siguientes frecuencias, expresadas en centímetros recíprocos: 1730, 1655 y 1550, lo que indica estiramiento del C=O del éster, y deformación del -CO-NH- y N-H, respectivamente.

10 2. Propiedades biológicas

La toxicidad letal (DL₅₀) por vía intravenosa en ratones, y la pirogenicidad (dosis mínima necesaria para producir una elevación de 0,5°C en la temperatura del cuerpo) en conejos de los coloides acuosos de lípido A purificado son 250 mg/kg y de 2 a 5 µg/kg, respectivamente. En contraste, el valor DL₅₀ en ratones y la pirogenicidad en conejos del lípido A descrito en la Patente alemana nº 1.073.150 son aproximadamente 50 mg/kg y 0,02 µg/kg, respectivamente. Por tanto, es evidente que la toxicidad y pirogenicidad del lípido A purificado han disminuido considerablemente, en comparación con las del lípido A descrito en dicha patente.

25 Los siguientes ejemplos exponen realizaciones ilustrativas de la presente invención que se prefieren actualmente. Las partes en volumen y las partes en peso están en la misma relación que los mililitros y los gramos. Los tantos por ciento son en peso.

Ejemplo 1

30 Una suspensión acuosa, aproximadamente al 5%, de cé-

316078



lulas bacterianas de *E. coli* se extrae con un volumen igual de fenol al 90%, a de 65 a 70°C, y la mezcla se centrifuga a 10.000 rpm durante 15 min. Los extractos acuosos se enfrían a baja temperatura y tratan con 5 volúmenes de acetona fría. Los precipitados floculentos recogidos por centrifugación se disuelven en agua y se dializan frente a agua corriente, durante 3 días. A cada 125 partes en volumen de la solución dializada, que contiene aproximadamente 3% del lipopolisacárido crudo, se añade un volumen igual de HCl 2 N que contiene 2% de cloruro sódico, y la mezcla se calienta en un tubo cerrado herméticamente, en un baño de agua caliente, durante 30 min. El hidrolizado se enfría y se extrae con cloroformo. A los extractos en cloroformo, después de lavados con agua, se añaden 5 volúmenes de acetona fría. Los precipitados floculentos se recogen, se lavan repetidamente con acetona, y se secan bajo vacío. Este material se designa como lípido A crudo.

El rendimiento de lípido A crudo derivado de 2500 partes en peso de células húmedas es aproximadamente de 3,1 partes en peso.

Un polvo mixto de 60 partes en peso de ácido silícico (Mallinckrodt, 149 micras, adecuado para análisis cromatográficos) y 30 partes en peso de sílice de diatomeas (Hyflo Super-cel), secado a 100°C durante 1 hora, se suspende en cloroformo, después de haber lavado con agua destilada y después con metanol, y la suspensión diluida se vierte después en un tubo cromatográfico. Por la parte superior de la columna se introduce 1 parte en peso de la fracción de lípido A crudo, disuelta en 60 partes en volumen de cloroformo, y se deja que caiga lentamente. Después de eluir con 500 par



tes en volumen de cloroformo, la fracción de lípido A pu-
 rificado se eluye con 1000 partes en volumen de metanol al
 40% que contiene cloroformo. La solución eluída se concen-
 tra hasta un volumen pequeño, bajo vacío, y se trata con
 5 10 volúmenes de acetona fría. Los precipitados resultantes
 se recogen por centrifugación y se secan bajo vacío.

El rendimiento de lípido A purificado es de 0,722 par-
 tes en peso. Funde a de 175 a 180°C.

Ejemplo 2

10

1,2 partes en peso de fracciones de lípido A crudo
 se disuelven en 30 partes en volumen de cloroformo; la so-
 lución resultante se vierte en una columna cromatográfica
 de ácido silícico. Después de haberse lavado primero la
 15 columna con 500 partes en volumen de cloroformo, las frac-
 ciones de lípido A purificado se eluyen con 1000 partes en
 volumen de metanol al 40%, que contiene cloroformo, de la
 misma forma descrita en el ejemplo 1.

Las soluciones eluídas se concentran hasta un volu-
 men pequeño, bajo vacío, y a la solución concentrada se
 añaden 5 volúmenes de acetona fría, y se deja enfriar en
 un refrigerador durante una noche.

Los precipitados floculentos se recogen por centrifu-
 gación, se lavan con acetona, y se secan bajo vacío.

25 El rendimiento de lípido A purificado es de 0,840
 partes en peso.

El lípido A purificado obtenido por el procedimiento
 de la presente invención, como se ha descrito antes, nues-
 tra un efecto inhibitor definido contra los tumores experi-
 mentales en ratones, no viéndose apenas signos de efectos
 30



secundarios. El lípido A purificado refuerza también la resistencia a la infección, y refuerza la producción de anticuerpos.

5 El nuevo producto de la presente invención es útil para reforzar la resistencia a las enfermedades infecciosas microbianas, particularmente a las enfermedades infecciosas bacterianas gram-negativas, tales como las debidas a los organismos patógenos *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, etc, por ejemplo la diarrea epidémica, diarrea de la ternera, etc.

10 El lípido A se puede derivar del cultivo de una enterobacteria tal como *E. coli*. Entre las cepas de esta última que se pueden usar en los anteriores ejemplos ilustrativos se incluyen, por ejemplo, la *E. coli communis* nº 602 y la *E. coli communior* nº 30.

NOTA

20 Los puntos de invención propia, no nueva, pero no establecida, practicada ni divulgada en España, que se presentan para que sean objeto de la presente solicitud de Patente de Introducción, por DIEZ años, son los siguientes:

25 1.- Un procedimiento para preparar lípido A purificado a partir de lipopolisacáridos derivados de bacterias gram-negativas por extracción con fenol y por hidrólisis ácida del extracto así obtenido, que comprende disolver lípido A crudo en cloroformo, fraccionar las fracciones re-

17 SEP



5
sultantes del lípido A crudo en una columna de ácido silícico por medio de eluyente de cloroformo y metanol, en proporción de 6 a 4, separar por destilación los disolventes de las fracciones así obtenidas, añadir acetona a la solución concentrada resultante de lípido A purificado, recoger los precipitados floculentos por centrifugación y secar en vacío.

10
2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que las bacterias gram-negativas son *Enterobacteriaceas*.

3.- Un procedimiento según la reivindicación 2, en el que las *Enterobacteriaceas* es *Escherichia coli*.

15
4.- Un procedimiento para purificar fracciones de lípido A crudo por medio de cromatografía en una columna de adsorbente, seguido por elución con un eluyente, que comprende la mejora en la que el adsorbente es una mezcla de ácido silícico y sílice de diatomeas y el eluyente es una mezcla de aproximadamente 6 partes en volumen de cloroformo y aproximadamente 4 partes en volumen de metanol.

20
5.- Un procedimiento según la reivindicación 4, en el que la proporción en peso de ácido silícico a sílice de diatomeas es aproximadamente 2 a 1.

25
6.- Un procedimiento para preparar lípido A purificado a partir de lipopolisacáridos derivados de bacterias gram-negativas.

316078



Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y para los fines que se han especificado.

La presente Memoria consta de nueve hojas, escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 17 SEP. 1965

P. A.

Alberto de Elzaburu
Por Poder

318078