



336219

PATENTE DE INVENCION

por 20 años

por "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN CONCENTRADO DE UN FACTOR BIFIDIGENO", a favor de URSINA A.G., de nacionalidad suiza, domiciliada en KONOLFINGEN (BERNA, Suiza). Con prioridad de la Patente suiza n° 608/66 de fecha 18 de enero de 1.966.

=====

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente Patente de invención se refiere a un procedimiento destinado a la preparación de un concentrado provisto de una actividad específica elevada respecto a un factor bifidígeno llamado "Factor Bifidus 2" (BF2). Desde

5. los trabajos de Tissier se sabe que el bífido (llamado también por sus denominaciones latinas, Bifidibacterium bifidum, Lactobacillus bífido, Actinobacterium bifidum) es el huésped o habitante predominante en el intestino del niño lactante.

Estos datos, conocidos desde hace tiempo, han sido
10. puestos al día por los estudios cuantitativos realizados por Seelinger.

En las heces del niño de pecho, el bífido representa más del 90% de los gérmenes que constituyen la flora intestinal. La lactancia artificial provoca un cambio radi-



ENE 1967

- 336219

- oal en esa flora intestinal. El bífido, si bien no desaparece por completo, sólo representa en el último caso una parte muy pequeña de los gérmenes de la flora intestinal del niño sometido a lactancia artificial, y una parte todavía menor
5. de dicha flora en el niño una vez terminada la lactancia y en el adulto.

- Desde hace mucho tiempo se hacen ensayos para modificar el régimen alimenticio de los niños de pecho sometidos a un régimen lactante artificial, de manera que el bífido
10. persista en las heces. Los regímenes capaces de realizar el fin indicado se llaman regímenes bífidos. Se puede obtener el fin citado de dos maneras:

- 12.- Por adiciones, cuyo mecanismo de acción es desconocido.
15. 22.- Añadiendo a la leche de vaca factores de crecimiento de los que son necesarios al bífido.

- En el primer grupo de medios figura la técnica de Petuely, que comporta un aumento de la relación lactosa/proteínas y la adición de lactulosa. Esta última no tiene ninguna
20. acción "in vitro" sobre el bífido.

Para realizar el segundo tipo de régimen es preciso conocer las necesidades de los factores de crecimiento especiales de las diferentes clases de bífidos.

- Algunos de los agentes que intervienen en la fermentación intestinal necesitan de un factor, denominado factor bífido 1, cuya función puede reemplazarse por la de una serie de derivados de la N-acetilglucosamina (Gyorgy, Kuhn), en particular por la 4,0-galactosidil N-acetilglucosamina y las beta-alquil N-acetilglucosaminidas. Se supone que este
25. agente particular presenta una deficiencia no identificada
30. en la cadena de reacciones que permite la síntesis del muc-



ENE 1967

péptido de la pared (Zilliken). Raynaud ha demostrado que la casi totalidad de las especies aislables a partir del intestino del lactante no necesitan de ese factor, pero que sólo se reproducen en presencia de otra sustancia a la que él ha llamado "factor bífidus 2".

Este factor se ha puesto de manifiesto mediante técnicas microbiológicas muy precisas. En un medio relativamente complejo, que contiene diversos aminoácidos, ácido paraaminobenzoico, biotina y pantotenato cálcico, el bífidus no se reproduce si no se añade un preparado que contenga el factor bífidus 2. El crecimiento se realiza entonces en cierta medida, proporcional a la cantidad de factor bífidus 2 añadida.

El medio utilizado tiene la siguiente composición:

15.	Asparagina	5 g.
	Aminoácidos, obtenidos por hidrólisis ácida de la cafeína (Casamino-ácidos Difco).	10 g.
	Cistina	0,200 g.
	Lactosa.	10 g.
	Acetato Sódico, 6 H ₂ O.	5 g.
20.	Sulfato magnésico, 7 H ₂ O.	0,5 g.
	Fosfato monoácido de sodio, 12 H ₂ O	2,33 g.
	Fosfato monopotásico	0,90 g.
	Acido paraaminobenzoico.	1 mg
	Biotina.	0,010 mg
25.	Pantotenato cálcico.	1 mg
	Agua, cantidad suficiente para	500 ml
	pH = 6,4	

Se utiliza este medio, llamado de doble fuerza, diluyéndolo a la mitad para el cultivo. Se puede definir así una unidad de factor bífidus 2 (unidad Raynaud) precisando



1967.

- 4 -

336219

- las condiciones experimentales del ensayo. Se emplean 2,5 mililitros del medio de doble fuerza y una simiente normalizada, siendo el volumen total de 5 mililitros. La unidad BF2 corresponde a la cantidad de factores que, después de cinco días de
5. cultivo en un medio anaerobio estricto, a la temperatura de 38 grados centígrados, asegura el crecimiento de una cantidad tal de gérmenes que provoca la formación de ácidos (ácido acético y ácido láctico) en cantidad equivalente a 1 mililitro de ácido de concentración decinormal en un tubo de 5 mililitros.
10. Este método de dosificación ha hecho posible comprobar que el factor BF2 no es igual a ninguno de los factores de crecimiento conocidos. En particular, no puede sustituirse por ninguna purina (adenina, guanina o hipochantina) ni por preparaciones ricas en estreptogenina.
15. Se ha observado que el factor BF2 se halla presente en cantidades variables, según las condiciones experimentales, en los hidrolizatos, enzimáticos de proteína, en particular de la caseína. Se ha podido preparar hidrolizatos enzimáticos ricos en BF2 que contienen de 5.000 a 20.000 unidades de BF2
20. por gramo. Gracias a estos preparados, se ha puesto de manifiesto, mediante numerosos ensayos en lactantes, que la adición a un régimen bifidígeno del factor BF2 permite aumentar considerablemente la proporción de bifidus en las heces. Para cantidades suficiente de BF2 se observa que el bifidus representa entonces del 40 al 95 por 100 de los gérmenes de la flora
25. intestinal.
- El invento objeto de la presente Patente se refiere a un procedimiento según el cual se obtienen preparados muy ricos en BF2. El producto más puro que se ha obtenido contiene
30. hasta 3.000.000 de unidades BF2 por gramo y es de naturaleza peptídica.



1967.

- 5 - 336219

El procedimiento, según la invención, comporta una serie de cromatografías con resinas cambiadoras de iones o con gel dextrana.

Al poner en práctica el procedimiento según la presente invención, la primera cromatografía puede realizarse con resina Dowex 50 x 4 (partículas de dimensiones 0,3 a 0,15 milímetros) en fase H⁺.

Se disuelven 100 gramos de hidrolizado de proteína, conteniendo el factor EF2, en ácido sulfúrico normal (por ejemplo, 100 gramos en 1.000 mililitros). La parte insoluble que eventualmente se halle presente será eliminada por filtración.

La disolución clara se recibe sobre una columna de resina DOWEX 50 x 2 (partículas de tamaño 0,3 a 0,15 milímetros) (por ejemplo, 600 gramos de resina en una columna de 2,5 por 35 centímetros de altura). La parte que atraviesa la columna sin ser absorbida se elimina. La fracción que queda fija sobre la columna se trata con una disolución de amoníaco 2N y después con agua (por ejemplo, 1000 mililitros de cada uno de los citados líquidos). La fracción así obtenida se concentra hasta la mitad de su volumen en vacío: el amoníaco resulta así eliminado en su mayor parte.

Se realiza una segunda cromatografía con una resina de amberlita IRC-50 (partículas de tamaño 0,3 a 0,15 milímetros) (por ejemplo, 500 gramos de resina en columna de 2,5 por 35 centímetros). Previamente se equilibra la resina con un tampón de acetato amónico 0,1 M de pH = 4,7.

La disolución obtenida después de la primera cromatografía y concentrada al 50 por 100 se lleva entonces a la parte superior de la columna.

Se recoge la fracción no absorbida. El tratamiento



JUNE 1967

- 6 -

336219

se completa con el paso de un volumen suficiente de disolución tampón acetato de amonio 0,1 M con pH = 4,7.

La totalidad de los líquidos obtenidos a la salida y que contiene la fracción no absorbida en las condiciones

5. descritas, se concentra en vacío y se deseca por sublimación al vacío o bien por liofilización. El producto obtenido se designará con el nombre de fracción N.

- Ejemplo: Columna conteniendo 500 gramos de resina amberlita IRC 50, diámetro 2,5 centímetros, altura 35 cm. Volumen de líquido aplicado a la columna, 1000 mililitros. Volumen de solución tampón resultante, 1000 mililitros.
- 10.

- La fracción N tiene un título de 20.000 a 25.000 unidades BF2 por gramo. Ello significa el 12 al 16 por 100 del hidrolizato proteásico inicial. El rendimiento en factor bífidus 2 varía esta operación del 40 al 70 por 100, según la naturaleza del hidrolizato.
- 15.

La fracción N se puede emplear como preparación semipurificada de BF2 en la alimentación del lactante.

- Una purificación más acentuada del BF2 se puede realizar de la siguiente manera: Se realiza una cromatografía con resina Dowex 50 W X 2, (tamaño de las partículas 0,075 a 0,037 milímetros)(por ejemplo, para una disolución de 2 gramos de fracción N en 100 mililitros de agua, se puede emplear 750 gramos de la resina mencionada en una columna de 2,5 por 15 centímetros). La resina se equilibra previamente con una disolución tampón de acetato de amonio 0,2 M, de pH = 5,46. La elución se asegura con la misma disolución tampón, que circula a velocidad constante (por ejemplo, 120 mililitros por hora). Se recoge la fracción que contiene el BF2, fracción que puede variar según las características de la columna utilizada. En el ejemplo anterior, ese factor pasa en la frac-
- 20.
 - 25.
 - 30.



1967.

- 7 -

336219

ción fluida entre 3,2 y 7,5 mililitros.

La disolución obtenida se concentra al vacío y se seca por sublimación o por liofilización. El producto obtenido en las condiciones de cortadura más favorable representa el 0,56 por 100 del peso inicial de hidrolizato y contiene el 28 por 100 de la actividad BF2. Su título es de 500.000 unidades por gramo.

Según una variante del procedimiento, el producto N, en disolución acuosa tan concentrada como sea posible (20 por miligramos por mililitro, por ejemplo), se somete a una filtración sobre gel de Dextrana (o Sefadex G25). Se recoge la fracción parcialmente separada, que contiene el BF2. Esta fracción, denominada NS, contiene la casi totalidad del BF2 (rendimiento del 90 al 100%) y posee una actividad específica comprendida entre 25.000 y 50.000 unidades por gramo. Puede utilizarse como preparación bifidígena.

Según otra variante, la fracción N o la fracción NS mencionada anteriormente se somete a una cromatografía con Dowex IX2.

La elución se asegura con un gradiente de ácido acético en acetato de piridina y de colidina. Los productos eluidos se identifican por su reactividad con la ninidrina. Aparecen bajo la forma de una serie de picos, unos 20 en total. El número de estos picos varía según la naturaleza del hidrolizato que sirvió para preparar la fracción N o la NS.

La actividad BF2 aparece en uno solo de los picos.

Ejemplo: Columna de 150 x 2 cm de Dowex IX2, temperatura 35° centígrados, velocidad de circulación del líquido a través de la columna 40 mililitros por hora. Fracciones recogidas, 10 mililitros.

Se eluye primeramente con acetato de piridina al 1% y pH = 8. El primer ingrediente se obtiene haciendo llegar



1967

- 8 -

336219

a una mezcla de colidina al 1%, de piridina al 1%, y ácido acético en cantidad suficiente para que el pH sea de 7,5, ácido acético 0,1 N. Se aplica a continuación un segundo gradiente (ácido acético 2N), fracción 150-250, y un tercer

5. gradiente (ácido acético glacial).

Se dispone sobre la columna una solución que contiene de 100 a 300 miligramos de fracción N. La actividad BF2 aparece en el pico nº 17. Los demás picos son inactivos. El producto obtenido se designa por Np o NS-p. Contiene de

10. 500.000 a 1.000.000 de unidades por gramo (el rendimiento en factor BF2 varía del 20 al 70 por 100). Puede emplearse como producto bifidígeno.

Los diversos preparados semipurificados o muy purificados, asociados a un régimen ordinario no bifidígeno,

15. administrados a un niño en cuyas heces el examen bacteriológico no permite hallar bífidos ("bifidibacterium bifidum", "lactobacillus bifidus") hacen aparecer este germen. La velocidad de aparición del bífidos en las heces a partir del momento en que se administra la preparación varía entre uno y

20. quince días, según la cantidad de factor BF2 aplicado. Con 5.000 a 10.000 unidades BF2 por día se precisa de 10 a 15 días para observar la aparición de bífidos en una proporción moderada comprendida entre el 10 y el 40 por 100 de la flora total. A partir de 100.000 unidades BF2, diarias, la aparición

25. de la flora bífida es muy rápida (de 1 a 3 días) y la proporción de bífidos es elevada: del 50 al 95 por 100 de la flora total.

Todo cuanto no afecte, altere, cambie o modifique la esencia del procedimiento descrito, será variable a los

30. efectos de la actual Patente.

N O T A.



ENE. 1967

- 9 -

336219

Se reivindica como objeto de esta Patente de invención:

- 1.- Procedimiento para la preparación de un concentrado de un factor bifidígeno, caracterizado esencialmente
5. porque permite la aparición, el mantenimiento o la reaparición de una flora bífida en los lactantes alimentados artificialmente, caracterizado por el hecho de que se somete a por lo menos dos cromatografías con resinas cambiadoras de iones o con gel de dextrana un hidrolizado enzimático de proteína
10. que contenga aquel factor.

2.- El propio procedimiento, según la reivindicación anterior, caracterizado por la utilización del concentrado obtenido por el procedimiento descrito, para la preparación de un alimento artificial para lactantes.

15. Sean cuales fueren las circunstancias que concurren en la esencialidad de la Patente de invención definida en las anteriores reivindicaciones, cuyo objeto es:

3.- "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE UN CONCENTRADO DE UN FACTOR BIFIDÍGENO".

20. Consta la presente memoria de nueve hojas foliadas, mecanografiadas por una sola cara.

Barcelona, 18 ENE 1967

P.A. de URSINA A.G.

mo.