

345151



18

345151

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

Solicitante: MAR-PHA SOCIETE D'ETUDES ET D'EXPLOITATION
DE MARQUES

Residencia: 7, rue Biscornet , 75-PARIS 12e, FRANCIA.

Enunciado: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE
UN FERMENTO LACTICO ANTIBIORESISTENTE"

PRIORIDAD: de la solicitud de patente francesa N^o
77.047 del 20 de septiembre de 1966.

R/G.



345151

1 El presente invento tiene por objeto un procedimiento para la preparación de un nuevo fermento lactico antibioresistente, útil en particular para mantener o restablecer el equilibrio bioquímico de la flora intestinal durante los tratamientos con antibioticos y análogos.

5

La utilización de los antibioticos de espectro antibacteriano ancho es cada vez más extenso, pero no puede hacer olvidar el peligro que representan para la flora intestinal saprófita.

10

La destrucción de esa flora conduce, como se sabe, a una carencia vitamínica "B" a la multiplicación de los gérmenes patógenos sobre los cuales los antibióticos no tienen acción (tales como piociánicos, ciertas especies de proteos y de estafilococo, candida albicans) y a una diarrea coleriforma de pronóstico extremadamente serio.

15

Para evitar este peligro es posible administrar fermentos lácticos en dosis fuertes.

20

Hasta la fecha se ha utilizado a este efecto fermentos lácticos constituidos por bacilos lácticos acidofilos vivos o muertos separados de su medio de cultivo y secados o liofilizados.

25

Sin embargo se ha descubierto, según el presente invento, que los extractos secos de cultivos enteros de bacilos lácticos tienen una actividad muy superior a la de los fermentos lácticos a base de bacilos lácticos puros, secados o liofilizados.

30

El presente invento tiene entonces por objeto un procedimiento de preparación de un nuevo fermento lactico antibioresistente, constituido por un extracto seco de cultivo entero de bacilos lácticos antibioresistentes



1 Un extracto de este tipo contiene un lisato de bacilos lácticos asociado con productos de metabolismo de dichos bacilos y con factores de crecimiento.

5 Los bacilos lácticos utilizables según el invento, comprenden notablemente los siguientes:

lactobacillus acidophilus

streptococcus lactis

lactobacillus bulgaricus

bacillus bifidus

10 bacillus thermophilus

bacillus subtilis y análogos.

Estos bacilos pueden utilizarse solos o en mezcla.

15 Según un modo de realización preferido, el nuevo fermento láctico está constituido por un extracto seco de cultivo entero de una mezcla de bacilos lácticos cultivados antibioresistentes: lactobacillus acidophilus Streptococcus lactis y Lactobacillus bulgaricus.

20 El presente invento tiene pues por objeto, un procedimiento para la preparación de un fermento láctico de este tipo. Según este procedimiento, se parte de un medio de cultivo que contiene esencialmente por una parte protidas, y más particularmente polipeptidas y ácidos aminos esenciales (tales como extracto de hígado, peptonas, etc.) por otra parte, profactores de vitaminas del grupo B (por ejemplo extracto de hígado...) y azúcares (por ejemplo lactosa, etc. ...)

25 Se siembra un medio de este tipo con ayuda de un cultivo de inseminación de bacilo láctico y se le cultiva a continuación en aerobia a una temperatura de 28° a 40° C aproximadamente durante un lapso de tiempo de

30



345151

1 48 horas a una semana aproximadamente.

Se detiene el cultivo en cuanto la concentración en gérmenes alcanza un valor aproximado a 10,57 gérmenes por ml...

5 Se mata entonces a los bacilos y a partir del cultivo entero se preparan extractos secos por liofilización o por desecación.

10 Se ilustrará el invento en lo que sigue por un ejemplo no limitativo de preparación del nuevo fermento láctico según el invento.

EJEMPLO

Se prepara un caldo de cultivo que tiene la siguiente composición por litro:

- Extracto de hígado 5 gramos
- 15 - Lactosa 4 gramos
- Peptona 2 gramos
- Agua q.s.p. 1.000 ml.

Se introduce un litro de este caldo en cada uno de los tres frascos de cultivo de una capacidad de 1,5 litros.

20 El contenido de cada frasco está esterilizado con autoclave a 120° C durante media hora e insemñado por 5 ml. de un cultivo sobre leche de 24 horas de uno de los microorganismos siguientes respectivamente:

- lactobacillus acidophilus
- 25 - lactobacillus bulgaricus
- streptococcus lactis

Los frascos después de su insemñación están mantenidos en autoclave a las siguientes temperaturas:

- bacillus acidophilus 37° C
- 30 - lactobacillus bulgaricus 40° C



1 - streptococcus lactis 28°C

Después de un tiempo del orden de 48 horas a una semana, en cuanto la concentración alcanza 10,5⁷ gérmenes por ml. aproximadamente, se sacan los cultivos del autoclave, se reúnen y se neutralizan hasta un pH de 6,5 por adición de una solución de NaOH, N, y concentradas bajo presión reducida (20 cms. de mercurio) y baja temperatura (inferior a 30°C) hasta conseguir una consistencia de jarabe.

10 La desecación del líquido en forma de jarabe se termina a continuación por concentración bajo vacío en un armario de bandejas de baja temperatura (inferior a 30°C)

Se obtiene para el conjunto de los tres frascos de cultivo, 25 gramos de extracto seco amarillento que contiene 10¹⁰ gérmenes por gramo, aproximadamente y menos de 5% de humedad.

En el medio de cultivo descrito más arriba, se puede sustituir 4 gramos de lactosa por 40 gramos de polvo de leche seca y se puede utilizar igualmente uno solo de los tres bacilos lácticos precitados en lugar de la mezcla de los tres.

En el ejemplo anterior, en lugar de proceder a la desecación del cultivo entero para preparar el extracto seco, se puede también recurrir a la técnica de liofilización, pero preferentemente con lisa previa con vista a matar a las bacterias y a estabilizar el extracto seco final.

En lo que sigue se ilustrará mediante pruebas sobre animales, la superioridad del nuevo fermento láctico respecto a los fermentos lácticos clásicos a base de ba-



1 cilos lácticos solos, vivos o matados.

Estas pruebas han sido realizadas todas sobre jóvenes ratas machos albinos Wistar repartidos en distintos lotes como sigue:

- 5 1º) un lote testigo sin tratar (A);
- 2º) un lote testigo sometido a un tratamiento de oxitetraciclina diario oral de 5 mg. por cada 100 grs. de peso del cuerpo (B);
- 10 3º) un lote que ha recibido a la vez con oxitetraciclina una igual cantidad de extracto seco de cultivo de bacilos lácticos según el invento (C);
- 4º) un lote que ha recibido además de la oxitetraciclina bacilos lácticos vivos separados de su medio de cultivo en cantidad igual a los obtenidos en el extracto según el invento (D);
- 15 5º) un lote que ha recibido además de la oxitetraciclina, unos bacilos lácticos matados (E);
- 6º) un lote que ha recibido además de la oxitetraciclina, un extracto seco del medio de cultivo según el invento sin sembrar (F).
- 20

En cada uno de los experimentos, cada lote era constituido por 10 animales, pero se ha repetido cada experimento cinco veces, por lo menos.

25 Los controles de los efectos ejercitados sobre esos lotes han sido:

- 30 - la curva de peso de los animales;
- el número de deposiciones y su hidratación según la técnica de Stern y Cahen (Arch. Int. Pharmacodyn. 1956 CVII 2 P. 178);
- el estudio bacteriológico de las deposiciones.



345 151

1 Los resultados obtenidos están ilustrados en las
figuras 1, 2 y 3 del dibujo adjunto. Al observar dichas
figuras, se puede notar lo siguiente:

5 a) - Según la figura 1, (que da las curvas de pe-
so de los animales en gramos en función del tiempo conta-
do en días) la curva de crecimiento de los animales que
han recibido a la vez con la oxitetraciclina extracto se-
co de cultivo de bacilos lácticos según el invento (cur-
va Cl), no presenta diferencias significativas respecto
10 a la de los animales testigos que no han recibido ningún
tratamiento (curva Al) mientras que la administración de
oxitetraciclina sola (curva Bl) ha producido una reduc-
ción de la curva de crecimiento tal, que al cabo de 30
días, el peso medio de estos animales era sensiblemente
15 el 62,5% del peso de los testigos no tratados.

Referente a las curvas de crecimiento de los ani-
males que han recibido además de la oxitetraciclina ba-
cilos vivos (curva Dl) o bacilos matados (curva El) o
un extracto del medio de cultivo virgen (curva Fl) aun-
20 que se situaran a un nivel superior a las de los anima-
les tratados por oxitetraciclina sola, quedaban sin em-
bargo muy inferiores a la de los animales no tratados.

Los pesos medios después de 30 días, han sido res-
pecto al peso de los animales testigos no tratados, del
25 78% para el lote que había recibido bacilos vivos, del
75% para el lote que había recibido bacilos matados y
del 68% para el lote al cual se había administrado medio
de cultivo virgen.

30 b) - Cada 5 días y durante 24 horas, se procedió
al recuento de las deposiciones de cada lote de animales.



1 La figura 2 dá el número de deposiciones durante 24 ho-
ras en función del tiempo en días. Para los animales
testigos que no habian recibido ningún tratamiento, el
número de deposiciones ha variado entre 10 y 15 y no ha
5 sufrido aumento en el curso del experimento (curva A2).

Al contrario el número de deposiciones de los lo-
tes que habian recibido oxitetraciclina sola (curva B2)
o completada por bacilos vivos (curva D2) o por bacilos
matados (curva E2) o por medio de cultivo virgen (cur-
10 va F2), aumentó bastante regularmente durante el expe-
rimento para cada uno de dichos cuatro lotes: su núme-
ro, que era de 10 a 15 en el comienzo, llegó a ser de
26 a 27 al final del experimento.

La adición de extracto seco de cultivos de baci-
15 los lácticos según el invento, ha reducido considerable-
mente el aumento del número de deposiciones puesto que
al final del experimento no habia más que 18 deposicio-
nes (curva G2).

La hidratación de las materias ha sido determina-
20 da midiendo el diámetro de la impresión de humedad dejada
por éstas sobre un papel filtro dispuesto sobre la ban-
deja inferior de las jaulas, conteniendo cada una de és-
tas tan solo dos animales según la técnica de Stern y
Cahen. La figura 3 indica el diámetro medio en centí-
25 metros de la impresión húmeda de las deposiciones sobre
el papel filtro en función del tiempo en días.

Mientras las materias fecales de los testigos no
tratados, no dejan ninguna impresión (curva A3), las de
los animales que han recibido tan solo oxitetraciclina
30 (curva B3) daban impresiones a partir de los días 10 y

345 151¹⁸



1 ll aumentando progresivamente hasta alcanzar una media de 2,3 cms. de diámetro los días 30 y 31.

5 El proceso es el mismo, pero en menor grado, para los lotes que han recibido además de la oxitetraciclina, bien bacilos matados (curva E3) bien bacilos vivos (curva D3) o bien medio de cultivo no sembrado (curva F3); la media del diámetro de las impresiones era de 1,1 cms. 1,2 cms., y 1,3 cms respectivamente para dichos tres lotes.

10 Respecto al lote al cual se administró conjuntamente con oxitetraciclina extracto seco de cultivo de bacilos lácticos según el invento, las impresiones han sido mucho menos importantes: aparición los días 15 y 16 de una ligera impresión (0,1 cm. de diámetro) con estabilización los días 30 y 31 a 0,2 cm. de diametro.

15 c) - La reimplantación de las deposiciones se realizó 48 horas después del final del tratamiento y de manera relativamente importante en los animales tratados con los extractos secos de cultivo de bacilos lácticos según el invento: la flora era constituida en mayor parte por bacilos coli y bacilos lácticos acidófilos (flora normal); mientras que en todos los demás lotes apareció, 48 horas después del final del tratamiento, tan solo una flora muy pobre constituida principalmente por cocci gram positivos (estafilococos, sarcinas, enterococos) o flora anormal.

20 Según los resultados de dichos experimentos se puede concluir que la adición de extractos secos de cultivos enteros de bacilos lácticos según el invento a un tratamiento severo a base de oxitetraciclina, mantiene

25

30



345151

1 una curva de crecimiento normal, reduce el número de depo-
siciones y su hidratación y permite un resembrado rápido
con una flora saprófita normal; cuyos efectos no pueden
5 obtenerse de manera tan completa mediante la administra-
ción, bien de bacilos lácticos vivos, bien de bacilos lác-
ticos matados, o bien del medio de cultivo virgen.

Los efectos favorables del tratamiento de los ex-
tractos secos de cultivos enteros de bacilos lácticos,
no pueden por consiguiente explicarse sino por una apor-
tación nutritiva que favorece selectivamente el resembrado
10 no solamente de los bacilos lácticos, sino también,
tal y como lo demuestran estos experimentos, de otros
gérmenes saprófitos normales, tales como el bacilo coli.

Sin embargo ni las células microbianas, ni el me-
dio de cultivo no sembrado solo, bastan para provocar
15 una buena reimplantación; a este efecto hace falta uti-
lizar el cultivo entero; conviene pues que además de los
constituyentes químicos de las células microbianas y de
las del medio de cultivo, estén presentes ciertos pro-
ductos del metabolismo microbiano que difunden en el
20 medio de cultivo.

Es pues importante, para evitar los inconvenien-
tes de la antibioterapia, mantener condiciones, en el
medio intestinal, tales que no solamente no se produzca
25 carencia de aportación de ciertos elementos (vitaminas
del grupo B en particular), normalmente provistos por
las bacterias saprófitas, sino también que estas bacte-
rias normales del intestino, y ellas solas, puedan reim-
plantarse espontánea y rápidamente en cuanto finaliza
30 el tratamiento antibiótico.



345151

- 1 (Sulfaguanidina 0,5 g.
IV) Fermento láctico según el invento 0,5 g.
(Excipiente q.s. para un comprimido

5 (El fermento láctico según el invento asegura además una reimplantación muy rápida de la flora normal).

En resumen la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

10 1. Un procedimiento para la preparación de un fermento láctico antibioresistente, caracterizado por que se parte de un medio de cultivo que contiene esencialmente por una parte unos prótidos, y más particularmente polieptidos y ácidos aminados esenciales, y por otra parte, profactores de vitaminas del grupo B y azúcares, se siembra un medio de este tipo con ayuda de un -
15 cultivo de sembrado de bacilo antibioresistente, se le cultiva a continuación en aerobia a una temperatura de 28° a 40° C aproximadamente durante 48 horas a una semana aproximadamente, se para el cultivo en cuanto la concentración en gérmenes ha llegado a un valor próximo a
20 10,5⁷ gérmenes por ml., se mata a los bacilos y se pone el cultivo entero obtenido en forma de extracto seco por desecación o liofilización.

25 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el bacilo láctico es el lactobacillus acidophilus y/o el Streptococcus lactis y/o el lactobacillus bulgaricus.



345151

1 3. Se reivindica por último como objeto sobre el
 que ha de recaer la Patente de Invención que se
solicita: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN FER-
MENTO LACTICO ANTIBIORESISTENTE".

5 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la pre-
sente Memoria descriptiva que consta de trece páginas meca-
nografiadas y dibujos adjuntos.

Madrid, 18 septiembre 1.967

10

BERNARDO UNGRIA

P.P.

15

20

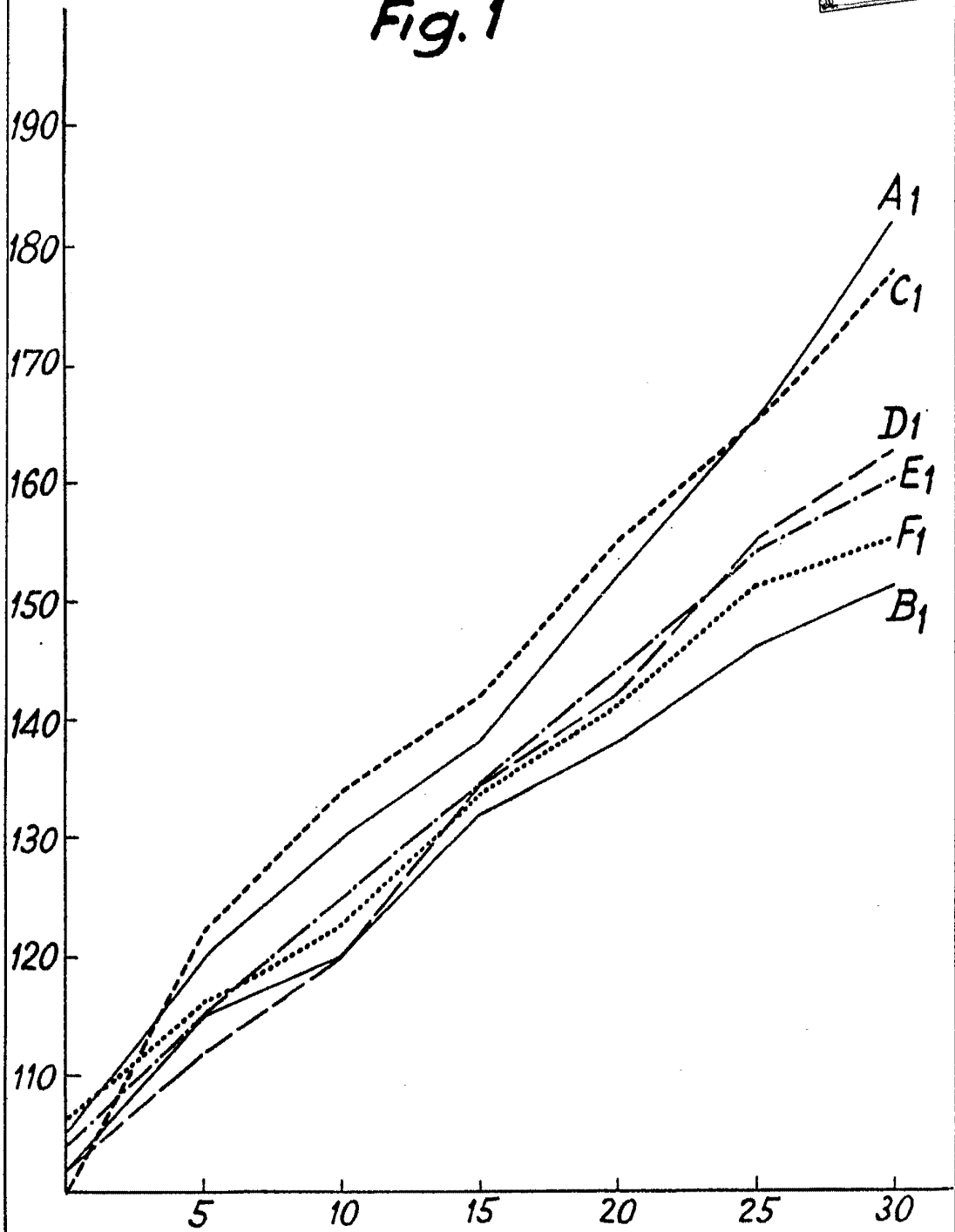
25

30

345151



Fig. 1



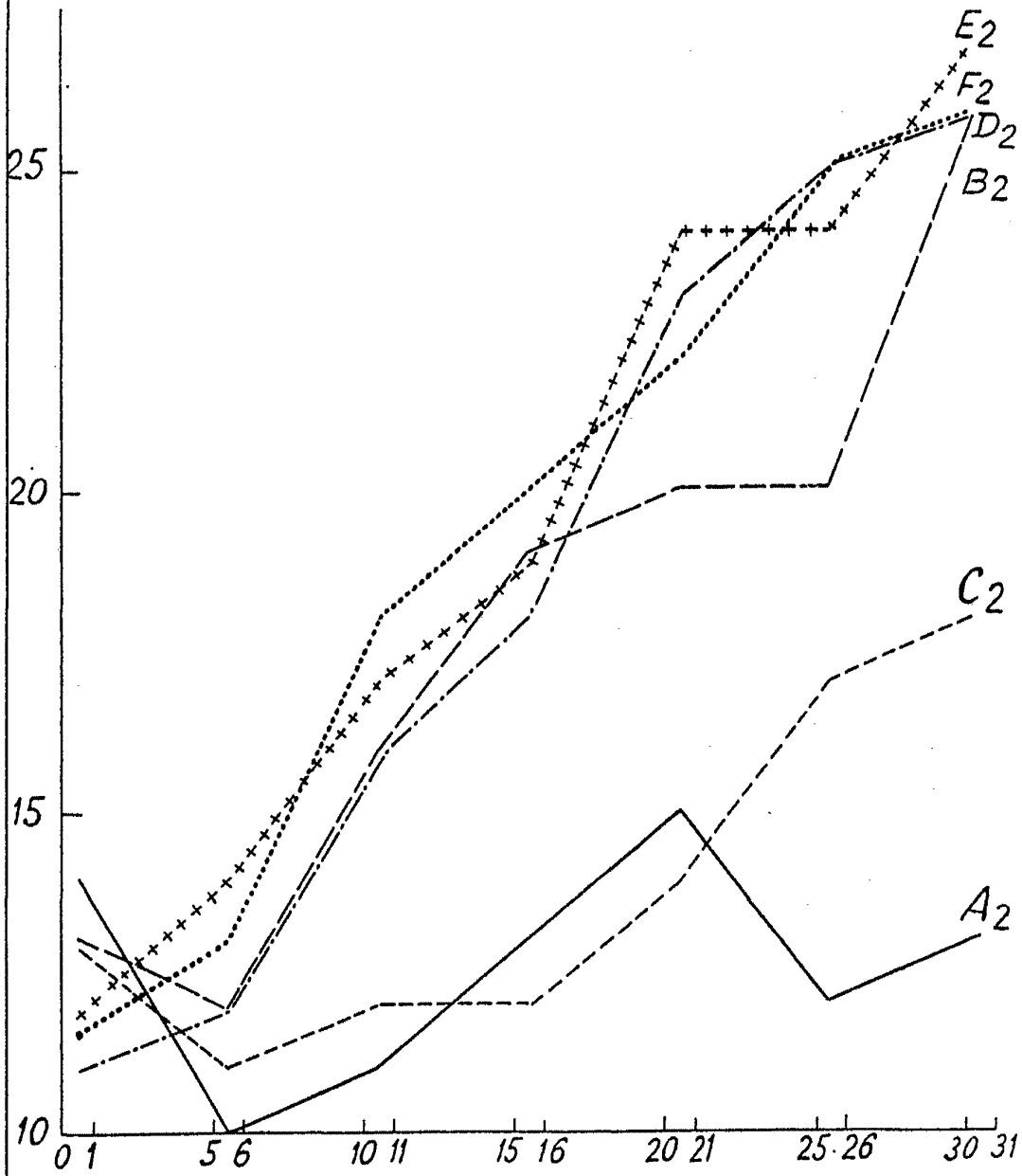
ESCALA VARIABLE
MADRID, 18 DE Septiembre DE 1967
BERNARDO UNGRÍA
P. P.

345151

18 SEP 1967



Fig. 2



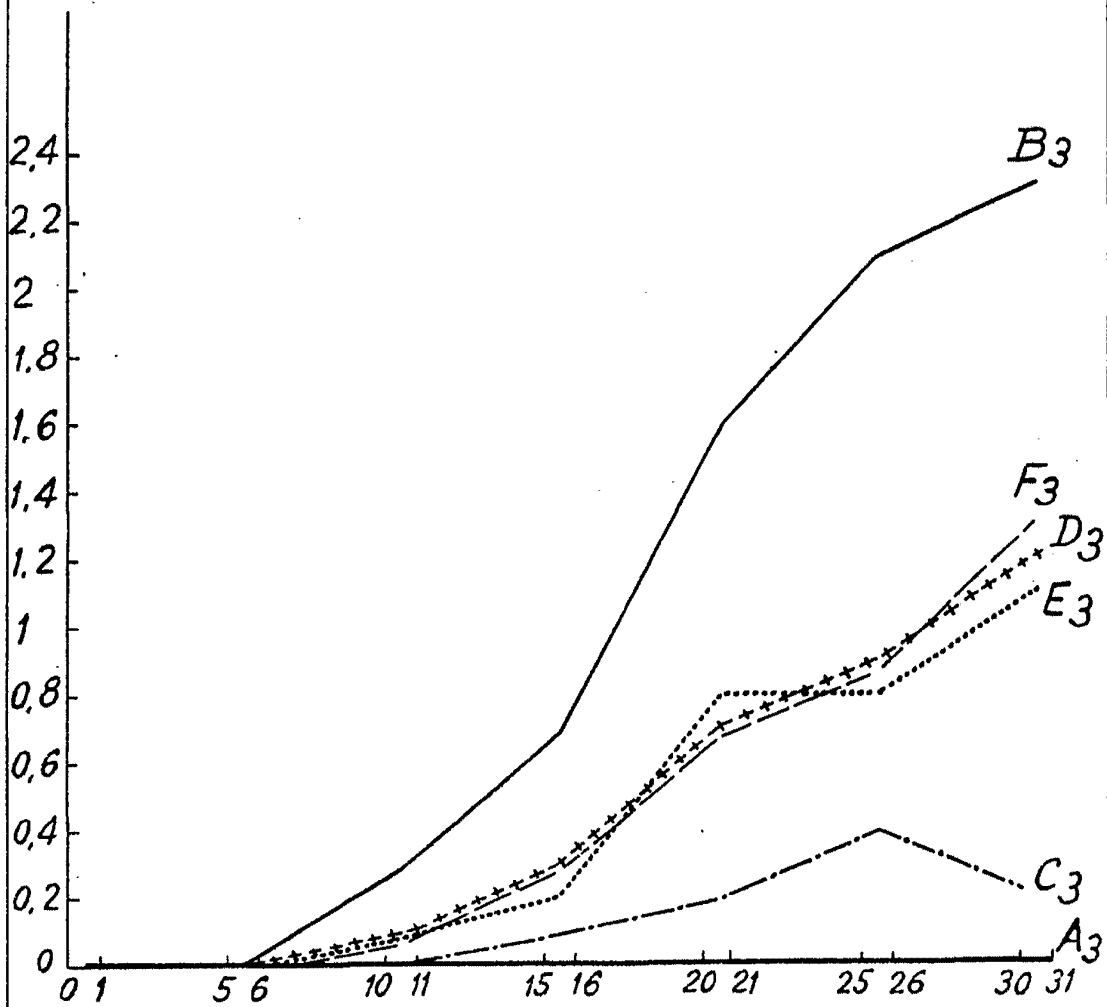
ESCALA VARIABLE
MADRID, 18 DE Septiembre DE 1967.
BERNARDO UNGRIA
P. P.

345151



18 SEP

Fig.3



ESCALA VARIABLE
MADRID, 18 DE Septiembre DE 1967
BERNARDO UNGRÍA
P. P.