

357845



27 AGO.

P A T E N T E
D E
I N V E N C I Ó N

a favor de CARTER-WALLACE, INC., entidad norteamericana,
domiciliada en New York, N.Y. 10016 (EE.UU.), 2 Park Avenue,
por "FRACCIONES BACTERIANAS".

- . -

MEMORIA DESCRIPTIVA

La invención se refiere a nuevas fracciones obtenibles del protoplasma bacteriano. Más particularmente la invención hace referencia a nuevas fracciones que son capaces de aumentar la resistencia a agentes infecciosos en animales de sangre caliente y que tienen un desusado grado de baja toxicidad y pirogenicidad.

5.

Desde hace cierto tiempo se ha reconocido que ciertas substancias, conocidas como endotoxinas, pueden ser obtenidas a partir de microorganismos, principalmente de bacterias gram-negativas.

10.

Estas endotoxinas, que son aisladas de las paredes de las células bacterianas por varios métodos de extracción, son generalmente características por estar compuestas predo-



minantemente de polisacáridos, y por tener cantidades substanciales de glucosamina y lípidos como componentes. En adición, las varias endotoxinas, incluso después de extensas etapas de purificación, todavía conservan grados substanciales de toxicidad y pirogenicidad.

Un objeto de la invención es el proveer nuevas fracciones de protoplasma bacteriano, las cuales son capaces de aumentar la resistencia a los agentes infecciosos en animales de sangre caliente, y que poseen un grado desusadamente bajo de toxicidad y pirogenicidad. Otro objeto de la invención es el proporcionar nuevas fracciones bacterianas que consisten principalmente de material proteínico y que contienen, a lo sumo, únicamente cantidades pequeñas de glucosamina, lípidos y polisacáridos. Estos y otros objetos resultarán más evidentes a los expertos en el ramo a la luz de la presente descripción, que sigue.

En su amplio aspecto, la invención se refiere a nuevas fracciones que son extraídas de protoplasma bacteriano, a diferencia de las paredes de las células bacterianas, de las cuales son obtenidas las endotoxinas. Estas fracciones, que han sido denominadas "protodyne", tienen las siguientes características:

a.- Un elevado contenido de material proteínico, en el orden de 85% o más alto.

b.- Un bajo contenido de glucosamina, en el orden del 2% o menos.

c.- Un bajo contenido de lípidos, en el orden de 2% o menos, expresado en términos de ácidos grasos libres.



d.- Un bajo contenido de carbohidratos, en el orden de 2% o menos.

e.- Son substancialmente estables cuando son calentadas en agua destilada, ácido acético 0,1 N; hidróxido amónico 0,01 N, o en tampón (pH 8,6), durante 5 minutos a 100 C.

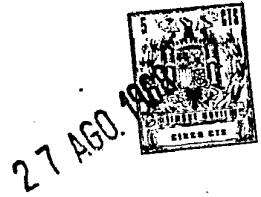
f.- Fácilmente solubles en NaOH 0,1 N, poco solubles en solución de urea 4M, e insolubles en agua, HCl 1N y HCl 0,1 N. Los estudios de solubilidad han sido realizados a una concentración de 10 mg de protodina por mililitro de disolvente.

g.- Por tener un coeficiente de extinción dentro de la gama de aproximadamente 9 hasta aproximadamente 22, medido a 280 milimicras y utilizando una solución de 1% peso/volumen de protodina en solución de NaOH 0,1 N.

Las fracciones preferidas de la invención están substancialmente libres de glucosamina, lípidos y carbohidratos.

La protodina puede ser obtenida de las células de microorganismos gram-negativos, tales como el Escherichia coli, cultivados en un medio adecuado. Mientras que los ejemplos detallados que siguen más adelante están dirigidos específicamente al E. coli, se sobreentiende que se puede utilizar de manera similar otros microorganismos gram-negativos. Por ejemplo, la protodina puede ser extraída con éxito a partir de células obtenidas de cultivos de Achromobacter xerosis y Serratia marcescens.

En general, el método de obtener la protodina de



las células implica las etapas de dividir o desintegrar las células para obtener de ellas el protoplasma bacteriano, separar el protoplasma de los materiales de las paredes celulares, y extraer la protodina de dicho protoplasma. A efectos comparativos, la fracción de endotoxina que se encuentra en el material de las paredes celulares, también es extraído en muchos de los trabajos experimentales.

La etapa de dividir o desintegrar las células puede ser llevada a cabo por uno cualquiera de varios métodos, esto es, por división celular mediante Zeolite, por desintegración celular mediante presión mecánica, o por división celular mediante congelación y fusión. A continuación se darán ejemplos detallados de cada uno de los métodos. El aislamiento de la protodina del protoplasma bacteriano es efectuado preferiblemente por extracción mediante fenol, independientemente del método utilizado para desintegrar o dividir las células.

Los siguientes son ejemplos operativos específicos para la producción de protodina de acuerdo con la presente invención..

E J E M P L O 1.

Etapa de desintegración.

a) Por división celular mediante Zeolite.

Se congela y divide células de E. coli (95,5 g) recién cosechadas, con 100 g de Zeolita 3A pulverizada (silicato de sodio y aluminio cristalino y deshidratado). Se añade hielo seco triturado a la masa seca para mantener la temperatura por debajo de 10^o C. La mezcla es agitada utili-



27/1/57

zando un mezclador Hobart durante unos 20-25 minutos, a 4 ° C y hasta obtener una masa pulverulenta.

A esta masa sólida se le añade 500 ml de una solución salina fisiológica y la suspensión es agitada a 4 ° C durante 5 minutos.

Después de centrifugación a aproximadamente 28000 x G durante una hora a 4 ° C, el líquido sobrenadante claro tiene un contenido sólido de 19,2 mg/ml (7,68 g), después de substracción del contenido salino.

El extracto celular es clarificado ulteriormente por centrifugación a aproximadamente 78000 x G a 4 ° C durante 2 horas en una centrifugadora Spinco Modelo L.

El extracto, que contiene 15,8 mg/ml de sólidos (5,77 g), es utilizado para la extracción con fenol, descrita a continuación.

b) Por desintegración celular mediante presión mecánica.

Se lava 95,3 g (peso húmedo) de células de E. coli recién cosechadas, dos veces con porciones de aproximadamente 300 ml de solución salina fisiológica a 4 ° C y se centrifuga durante 30 minutos a aproximadamente 30000 x G. Las células lavadas (69,5 g) son suspendidas en 650 ml de solución salina fisiológica y, el volumen es ajustado a 700 ml con solución salina. El contenido sólido es de 23,8 mg/ml (16,6 g) después de deducción del contenido salino.

La desintegración en el fraccionador de células Ribí (Modelo CF1) es llevada a cabo a aproximadamente 2110 $\frac{2}{\text{cm}}$ kp/cm², con una velocidad de circulación de gas de 59,5 m³ por hora, a temperaturas variables de 7 a 10 ° C. La suspen-



sión resultante es centrifugada a aproximadamente 48000 x G durante una hora a 4°C para separar el material de las paredes celulares del material protoplásmico.

La fracción de protoplasma bruto es clarificada por centrifugación a aproximadamente 78000 x G durante 2 horas en una centrifugadora Spinco modelo L, y luego utilizada para la extracción mediante fenol.

c) Por división mediante congelación o fusión.

Se congela 95,5 g de células de E. coli recientemente cosechadas. Las células congeladas son suspendidas en 250 ml de agua estéril y la mezcla es dispersada en un mezclador Waring, agitando durante unos 25 minutos a 4°C. La suspensión es centrifugada a aproximadamente 25000 x G durante 1 hora a 4°C. El líquido sobrenadante acuoso tiene un volumen de 350 ml y un contenido sólido de 15,5 mg/ml.

Este extracto acuoso de células es centrifugado a aproximadamente 78000 x G en una centrifugadora Spinco modelo L durante 2 horas a 4°C. El líquido sobrenadante claro, que tiene un volumen de 290 ml y un contenido sólido de 15,5 mg/ml, es extraído subsiguientemente con fenol, de acuerdo con el método del ejemplo II.

E J E M P L O II.

Extracción con fenol.

Una fracción protoplásmica obtenida después de desintegración celular por presión mecánica (1431 ml, contenido sólido de 9,6 mg/ml o 13,7 g de sólidos en total), es precalentada a 68°C y mezclada con un volumen igual (1431 ml) de fenol de 88% asimismo precalentado a 68°C. La mezcla es agitada a 68°C durante 30 minutos y enfriada rápidamente



a 8-10^o C. Después de centrifugación a aproximadamente 4000 x G durante 30 minutos, las fases son separadas la una de la otra. La fase fenólica es precalentada a 68^o C y agitada durante 10 minutos con un volumen igual de agua precalentada. Las fases son separadas por centrifugación tal como anteriormente.

La fase fenólica lavada es mezclada con 60 ml de solución saturada metanólica de acetato sódico. Se utiliza cuatro volúmenes (6000 ml) de alcohol metílico para precipitar un sólido esponjoso que es aislado por centrifugación a aproximadamente 28000 x G durante una hora a 4^o C. El residuo es suspendido en agua, dializado contra agua destilada fría corriente durante 48 horas a 4^o C y liofilizada. La producción de material protoplásmico soluble en fenol (Protodina) es de 1,46 g de un sólido amorfo e incoloro.

La tabla 1 siguiente, presenta un número representativo de fracciones de protodina de la presente invención, además de las características de las mismas. El contenido de biuret es indicativo de la cantidad de material proteínico presente. El contenido de carbohidrato indica la cantidad de polisacáridos presente en la fracción. El ensayo de ácidos grasos libres (FFA) es una medida del contenido de lípidos.

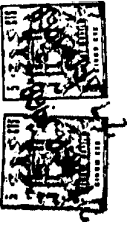


TABLA 1.

Preparación No	Origen	Método de división	C	H	N	O	P	Proteína ¹	Carbhidrato ²	FAA ³	E ⁴	Glucosamina ⁵
1	<u>E. coli</u>	MPC x	48.35	6.48	15.59	24.30	0.59	94.19	0.61	0.45	22.9	0.62
2	<u>E. coli</u>	MPC	48.55	6.59	15.55	26.70	0.33	99.90	0.30	0.78	15.8	0.76
3	<u>E. coli</u>	MPC	-	-	-	-	-	100.20	1.49	-	-	-
4	<u>E. coli</u>	IPG	49.36	6.85	15.37	27.56	-	93.95	0.62	0.43	15.3	0.50
5	<u>E. coli</u>	MPC	48.68	6.58	15.13	25.95	0.22	94.89	0.81	0.28	14.0	0.44
6	<u>E. coli</u>	MPC	-	-	-	-	0.27	86.50	<0.5	0.18	12.4	1.00
7	<u>E. coli</u>	Zeolita	49.15	7.22	15.78	27.49	0.01	95.40	0.98	0.06	9.7	naña
8	<u>A. xerosis</u>	MPC	49.31	7.01	15.60	26.85	0.33	85.70	0.20	0.05	10.3	1.10
9	<u>S. marcescens</u>	MPC	49.75	6.97	15.88	25.40	0.13	97.60	0.20	0.24	11.7	0.48
10	<u>S. marcescens</u>	MPC	49.47	7.37	15.27	24.67	0.09	90.0	1.80	1.13	11.5	0.63
11	<u>E. coli</u>	Congelación-fusión	-	-	-	-	-	95.43	1.15	0.27	-	-

x MPC: Desintegración celular por presión mecánica.

1: Contenido de proteínas determinado por ensayo de Biuret [Cornall et al., J. Biol Chem., 177, 751 (1948)].

2: Determinado por el método del triptofano [Fadin et al., Prac. Soc. Exptl. Biol. Med., 84, 288 (1953)].

3: Expresado como palmitato metílico y determinado por el método de cronatografía gas-líquido de Knivett y Cullen, Biochem. J., 96, 771, 1965.

4: Coeficiente de extensión, P₂₈₀ milimicras (NaOH 0.1N).

5: Determinado por el método de Elson y Morgan (Biochem. J., 27, 1824, 1933).

TABLA 1.

<u>Preparación Nº</u>	<u>Origen</u>	<u>Método de división</u>	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>	<u>O</u>
1	<u>E. coli</u>	MPC x	48.35	6.48	15.59	24.30
2	<u>E. coli</u>	MPC	48.55	6.59	15.55	26.70
3	<u>E. coli</u>	MPC	-	-	-	-
4	<u>E. coli</u>	MPC	49.36	6.85	15.37	27.56
5	<u>E. coli</u>	MPC	48.68	6.58	15.13	25.95
6	<u>E. coli</u>	MPC	-	-	-	-
7	<u>E. coli</u>	Zeolita	49.15	7.22	15.78	27.49
8	<u>A. xerosis</u>	MPC	49.31	7.01	15.60	26.85
9	<u>S. marcescens</u>	MPC	49.75	6.97	15.38	25.40
10	<u>S. marcescens</u>	MPC	49.47	7.37	15.27	24.67
11	<u>E. coli</u>	Congelación-fusión	-	-	-	-

x MPC: Desintegración celular por presión mecánica.

1: Contenido de proteínas determinado por ensayo de Biuret [Gorna

2: Determinado por el método del triptofano [Badin et al., Prac.

3: Expresado como palmitato metílico y determinado por el método 1965.

4: Coeficiente de extensión, $E_{280}^{1\%}$ milimicras (NaOH 0,1N).

5: Determinado por el método de Elson y Morgan (Biochem. J., 27,



TABLA 1.

<u>N</u>	<u>O</u>	<u>P</u>	<u>Proteína¹</u>	<u>Carbohidrato²</u>	<u>FFA³</u>	<u>E⁴</u>	<u>Glucosamina⁵</u>
15.59	24.30	0.59	94.19	0.61	0.45	22.9	0.62
15.55	26.70	0.33	99.90	0.30	0.78	15.8	0.76
-	-	-	100.20	1.49	-	-	-
15.37	27.56	-	93.95	0.62	0.43	15.3	0.50
15.13	25.95	0.22	94.89	0.81	0.28	14.0	0.44
-	-	0.27	86.50	<0.5	0.18	12.4	1.00
15.78	27.49	0.01	95.40	0.98	0.06	9.7	nada
15 60	26.85	0.33	85.70	0.20	0.06	10.3	1.10
15 88	25.40	0.13	97.60	0.20	0.24	11.7	0.48
15 27	24.67	0.09	90.0	1.80	1.13	11.5	0.63
-	-	-	95.43	1.15	0.27	-	-

uiuret [Gornall et al., J. Biol Chem., 177, 751 (1948)].

et al., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 84, 288 (1953)].

or el método de cromatografía gas-líquido de Knivett y Cullen, Biochem. J. 96, 771;

,LN).

hem. J., 27, 1824, 1933).



27 APR 1964

La capacidad de la protodina para favorecer la resistencia no específica contra las infecciones en animales de sangre caliente es evaluada en ratones de la raza Swiss Webster, utilizando Salmonella typhimurium, Salmonella typhosa, Salmonella enteritides, Pseudomonas aeruginosa, Diplococcus pneumoniae y Streptococcus mastiditis como agentes de infección. La protodina es suministrada intraperitonealmente a 5 niveles de dosificación distintos. Se utiliza grupos de 20 ratones para cada nivel de dosificación y la protodina es administrada en una inyección única, 24 horas antes de la infección. Los microorganismos, a excepción de la Pseudomonas aeruginosa, son administrados intraperitonealmente. En el caso de la Pseudomonas aeruginosa los ratones son infectados intravenosamente, 48 horas después del tratamiento con la protodina. Con todos los microorganismos, el número de células viables administrado, es ajustado en titulaciones preliminares para producir muertes en 90% de los animales dentro de las 48 horas. Cuando el 90% de los animales de control no tratados han muerto, usualmente 24 a 48 horas después de la infección, se calcula la dosis media de protección (PD₅₀), esto es, la dosis con la cual sobreviven el 50% de los animales tratados. Cada experimento es repetido de 3 a 5 veces con resultados similares.

Los resultados están relacionados en la tabla II siguiente:



27 AGO 1958

TABLA II.

AUMENTO DE LA RESISTENCIA A LA INFECCIÓN EN RATONES,
PRODUCIDOS POR LA PROTODINA PREPARADA DE ESCHERICHIA COLI.

<u>Organismo</u>	<u>Número de orga- nismos viables administrados</u>	<u>Protodina</u>	
		<u>PD 50 % mg/kg</u>	<u>Límites de confianza %</u>
<u>Salmonella typhosa</u>	4.55 x 10 ⁸	0.032	0.015 - 0.067
<u>Salmonella typhimurium</u>	1.12 x 10 ⁸	0.052	0.030 - 0.090
<u>Salmonella enteritidis</u>	1.3 x 10 ⁸	0.059	0.038 - 0.093
<u>Diplococcus pneumoniae</u>	7.0 x 10 ³	0.29	0.16 - 0.51
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	4.6 x 10 ⁷	0.44	0.27 - 0.70
<u>Streptococcus mastitidis</u>	9.7 x 10 ⁴	0.59	0.33 - 1.05

x Dosis que protege el 50% de los animales contra muerte por infección.

xxx Límites de confianza de 95%.

La pirogenicidad de la protodina es evaluada en conejos albinos de Nueva Zelanda machos, utilizando la técnica de Landy et al (Fed. Proc., 1957, v 16, 857). La protodina, en dosis de 0,5 microgramos por kilogramo, produce un aumento máximo de temperatura de 0,44 ± 0,055°C, substancialmente más bajo que los valores denunciados para las endotoxi



nas.

En adición, la protodina aparece prácticamente atóxica. Los ratones toleran una dosis de 400 mg/kg, intraperitonealmente, sin ningún cambio discernible en aspecto o comportamiento.

- . -

N O T A

Se reivindica como objeto de la presente patente de invención:

10. 1. Procedimiento para la obtención de fracciones bacterianas, caracterizado esencialmente por el hecho de someter una preparación que comprende células bacterianas a un proceso de división o desintegración celular, después de lo cual el producto obtenido es sometido a una fase de separación para aislar el protoplasma del material de las paredes celulares, extrayendo finalmente dicho protoplasma para obtener la fracción bacteriana o protodina.
15. 2. Procedimiento para la obtención de fracciones bacterianas, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la preparación de partida comprende bacterias gram-negativas.
20. 3. Procedimiento para la obtención de fracciones bacterianas, según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por el hecho de que los micro-organismos gram-negativos son elegidos de entre el grupo formado por Achromobacter



27

xerosis y Serratia marcescens.

4. Procedimiento para la obtención de fracciones bacterianas, según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por el hecho de utilizar cultivos de bacteria gram-negativa Escherichia coli.
5. Procedimiento para la obtención de fracciones bacterianas, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la división celular es realizada mediante Zeolite o por congelación y fusión.
10. 6. Procedimiento para la obtención de fracciones bacterianas, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la desintegración mecánica es llevada a cabo por medio de presión mecánica.
15. 7. Procedimiento para la obtención de fracciones bacterianas, según la reivindicación 1; caracterizado por el hecho de que el protoplasma es separado del material de paredes celulares mediante clarificación.
20. 8. Procedimiento para la obtención de fracciones bacterianas, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la protodina es aislada del material de protoplasma por extracción mediante disolventes.
25. 9. Procedimiento para la obtención de fracciones bacterianas, según las reivindicaciones 1 y 8, caracterizado por el hecho de que la extracción de la protodina se realiza mediante fenol.
10. Procedimiento para la obtención de fracciones bacterianas.

Todo ello según queda descrito y reivindicado

27 AGO.



en la presente memoria descriptiva que consta de trece
hojas foliadas escritas a máquina por una sola cara.

Barcelona, 27 de agosto 1968

CARTER-WALLACE, INC.

p.a.

I. PONTI

P. O.