



19 ES	11 NUMERO 445.460	10 A 1
	21	
	22 FECHA DE PRESENTACION 14.2.76	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
---	---	---

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D//A61K	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA ---
------------------------	--	---

64 TITULO DE LA INVENCION

"PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE SUSTANCIAS INHIBIDORAS DEL CRECIMIENTO BACTERIANO"

71 SOLICITANTE (S)

D. Fernando Baquero Mochales y D. Carlos Asensio Bretones

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

Ardemans, 68 - MADRID y Capitán Haya, 34 - MADRID

72 INVENTOR (ES)

los propios solicitantes

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

MARCELINO CURELL SUROL

R-3995-5

UNE A-4 MOD. 3106

UTILÍZASE COMO PRIMERA PAGINA DE LA MEMORIA

CONCEDIDA

21 FEB. 1977

**POOR
QUALITY**

PATENTES DE INVENCIÓN

por VEINTE años

- solicitada en España a favor de D. Fernando Baquero Mochales y Carlos Asensio Bretones, de nacionalidad española domiciliados en Madrid, Ardemans, 68 y Capitán Maya, 34 respectivamente, por "Procedimiento de obtención de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano". - - - - -
- 5.

MEMORIA DESCRIPTIVA

- La presente invención, conforme indica su enunciado, se refiere a un procedimiento de obtención de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano, que en la presente memoria se denominan con la expresión "microcinas".-
- 10.

- Se ha encontrado que la flora del tracto intestinal humano sufre unas oscilaciones recurrentes cuali y - cuantitativas, de carácter normal o patológico, que se caracterizan por su rapidez y especificidad biológica. Estos cambios poblacionales son particularmente acusados en los recién nacidos y niños pequeños, en los que dicho fenómeno se ha estudiado principalmente en las bacterias aoro
- 15.

bias facultativas, más específicamente en las Enterobacteriáceas. - - - - -

- Se ha invocado hasta el presente varios tipos de factores que podrían estar implicados en los citados desplazamientos bacterianos, pero se acepta de hecho que ninguno de ellos, de forma aislada o convergente con otros, pueden dar cuenta de las características del proceso, particularmente de su alta especificidad, que permite, por ejemplo, una rápida sucesión ecológica de variantes muy similares de una misma especie bacteriana. En ocasiones se ha pretendido que las colicinas, en el caso de las Enterobacteriáceas, podrían ser los principales factores antagonizantes específicos de tales desplazamientos. Esta pretensión, sin embargo, no ha podido demostrarse de forma satisfactoria. - - - - -
- 5.
 - 10.
 - 15.

- Dada la importancia del problema y ante las posibles implicaciones terapéuticas que podrían derivarse del estudio del mismo, a los efectos de la invención se ha iniciado una exploración sistemática de posibles factores antagonizantes entre la flora intestinal infantil, utilizando organismos aislados del contenido fecal de niños lactantes. Dicha búsqueda se ha polarizado intencionalmente sobre posibles agentes de bajo peso molecular para eliminar otros compuestos ya conocidos que poseen una intensa actividad antibiótica como las bacteriocinas (p.ej. viridinas) y, especialmente, las Colicinas cuya -
- 20.
 - 25.

utilización en terapéutica se ha demostrado ineficaz. Am
bas series de compuestos poseen un elevado peso molecu-
lar mientras que la sustancia obtenida según la invención,
denominada en lo sucesivo "Microcinas" se caracteriza, en-
tre otras propiedades, por poseer una elevada actividad -
antimicrobiana y un bajo peso molecular que tanto en la -
"Microcina 15" como en otras Microcinas estudiadas, es in
ferior a 1000. - - - - -

10. hasta el presente se ha hecho una prospección y es-
tudio sobre aproximadamente 400 microorganismos aislados -
de las heces de niños lactantes, que una vez identificados
a nivel de especie, fueron ensayados como productores po-
tenciales de antibióticos activos sobre varias especies de
15. *Escherichia coli* (cepas K 12); cepa D (CECT 101); cepa Mc
Leod (CECT 405), cepa W (CECT 99). (CECT = Colección Espa-
ñola de Cultivos tipo (Elbeo)). - - - - -

Para ello se procedió sistemáticamente de la si-
guiente forma: - - - - -

- 20. a) Las cepas a ensayar se inocularon en forma de
"botones" sobre una película de celofán adheri-
da sobre la superficie de placas de agar, en -
las que se había sembrado previamente cada una
de las cepas indicadores mencionadas. - - - - -
- 25. b) Dichas placas contenían un medio mínimo (gluco-
sa al 0,2% y sales minerales). - - - - -

5. c) Sólo se consideraron como cepas potencialmente productoras aquellas que provocaron un claro halo de inhibición sobre el crecimiento de las cepas indicadoras, con un diámetro netamente mayor que el correspondiente a los "botones". - - - - -

10. Con este tipo de ensayo, se eliminó sistemáticamente la posible inhibición debida a colicinas y otras bacteriocinas que como hemos dicho anteriormente son de elevado peso molecular (mayor de 40.000) y por tanto son retenidas por el colofán. También se eliminó de forma sensible la interferencia de posibles efectoras de inhibición inespecíficos (cambios de pH, competencia nutricional, etc.) ya que éstas producen, si acaso halos de menor diámetro. - - - - -

15.

El resultado de este estudio preliminar condujo a la sorprendente conclusión de que alrededor del 15% de las cepas ensayadas eran netamente positivas. - - - - -

20. Las cepas más activas fueron subsiguientemente crecidas en medios líquidos, también en medio mínimo. Los sobrenadantes de estos cultivos que mostraban también antibiosis positiva, fueron concentrados a vacío hasta 1/20 del volumen original, y luego tratados con 5 vol. de metanol. Con este procedimiento se consiguieron, en la generalidad de los casos, preparaciones de gran potencia anti

25.

biótica y exentas de la mayor parte de las sales y macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos, etc.) del sobrenadante original. - - - - -

5. Con las preparaciones anteriores concentradas de nuevo a presión reducida hasta un 1/500 del volumen original y parcialmente purificadas según se ha descrito, se procedió a una caracterización preliminar de la "Microcina 15" empleando varios parámetros físico-químicos y enzimológicos (especificidad de acción). La Tabla I que viene a continuación resume los resultados obtenidos con la "Microcina 15". - - - - -
- 10.

TABLA I

"MICROCINA 15" (concentrado del caldo al 1/500)

Propiedades

15. Peso molecular 500
Termorresistencia (100° C - 30 min) Resiste
Retención por carbón activo No se retiene
Resistencia a pH 1 (durante 3 h.) Resistente
Resistencia a pH 12 (durante 3 h.) Resistente
20. Resistencia a Pronasa * Resistente
Resistencia a Subtilisina ** Resistente
- Antagonismo por Metionina (10 µg/ml)
(Aminoácidos, Bases y Vitaminas)
- * 3 horas 10 µg/ml
** 3 horas 10 µg/ml

El espectro antibiótico de la "Microcina 15" mostrada en la Tabla II es de tipo genérico, e incluye la respuesta sobre unos sesenta microorganismos pertenecientes a 13 géneros distintos, en su mayoría de la familia Enterobacteriaceae. El ensayo se realizó con 0,01 ml de la preparación de microcina concentrada (1 x 500) y parcialmente purificada. La conclusión general es que posee un amplio espectro de acción, si bien muestra cierto grado de especificidad entre las especies filogenéticamente más próximas a las cepas productoras. - - - - -

TABLA II

ESPECIFICIDAD DE ANTIBIOSIS DE LA "MICROCINA 15" SOBRE ENTEROBACTERIAS Y OTROS MICROORGANISMOS.

	<u>Microorganismos</u>	<u>Nº cepas ensayadas</u>	<u>Nº cepas sensibles</u>
15.	Escherichia	20	20
	Proteus	11	11
	Enterobacter	7	5
	Klebsiella	3	3
	Serratia	3	3
20.	Salmonella	3	2
	Pseudomonas	3	3
	Levinea	2	2
	Shigella	2	2
	Citrobacter	2	2
25.	Acinetobacter	2	2
	Streptococcus	2	2
	Staphylococcus	5	0

Una propiedad de extraordinario interés, explorada en esta cepa productora de la "Microcina 15" es el carácter de transmisibilidad genética de la capacidad de producir este antibiótico, por vía plasmídica, a otras cepas que no lo producen. - - - - -

Ensayada la acción antibiótica del compuesto, sobre distintas especies del género *Candida* que se mencionan, a continuación, los resultados obtenidos se indican en la tabla III. - - - - -

10. TABLA III

ACCION ANTIBIOTICA DE LA "MICROCINA 15" SOBRE DIFERENTES ESPECIES DEL GENERO CANDIDA.

	<u>Nº de ensayos</u>	<u>Actividad</u>
Candida albicans	6	0
15. Candida tropicalis	5	0
Candida para krusei	2	0
Candida krusei	1	0

Los resultados obtenidos hacen suponer que el compuesto que denominamos "Microcina 15" carece de actividad sobre las especies de dicho género de levaduras. - - - - -

La información obtenida hasta el presente sugiere de forma convincente que: - - - - -

- a) Existen muchas más entidades antibióticas similares a la "microcina 15" que son distintas en-

tre sí y también distintas de las identifica-
das hasta el presente. - - - - -

5. b) El método de selección y procedimientos utili-
zados en el referido estudio, han demostrado
ser apropiados para conseguir una exploración
general de este tipo de sustancias. - - - - -

10. c) El compuesto antibiótico hasta ahora caracteri-
zado es diferente de los antibióticos conoci-
dos, los cuales en conjunto pueden agruparse -
en dos grandes grupos con características cla-
ramente diferenciadas distintivas de las que -
tipifican el grupo del citado estudio. Así, -
los antibióticos convencionales pueden englobarse en:
- - - - -

15. 1) los producidos por bacterias micela-
das, particularmente Actinomicetos,
y dentro de éstos mayormente por dis-
tintas especies de Streptomyces, son
de estructuras químicas muy heterogé-
neas, y en general de amplio espec-
tro de acción antibiótica. - - - - -

20. ii) los producidos por bacterias esporo-
gónicas del género Bacillus, tales -
como la bacitracina, polimixina y ti-
rotricina. Están constituidos por -
25. oligopéptidos cíclicos y no se excre-

tan en los medios de cultivo. Son también en general de amplio especto de acción. - - - - -

Por el contrario, los antibióticos ahora identifica

5. dos, para los que se propone el nombre genérico de Microcinas constituyen una serie nueva de la que forma parte la denominada como "Microcina 15". Estas Microcinas son producidas por una cepa de Escherichia coli denominada en los sucesivos "E. coli 15" aislada del contenido fecal del tracto intestinal de un niño lactante. En estos microorganismos se desconocía hasta el presente la capacidad de antibiogenesis (excepto la de producir colicina, que de hecho no se consideran antibióticos en el sentido convencional). Las Microcinas son excretadas al medio de cultivo y actúan de forma relativamente específica sobre especies de microorganismos filogenéticamente afines y poseen un bajo peso molecular, muy inferior al de las Colicinas. - - - - -
- 10.
- 15.

- A continuación se describe el procedimiento de obtención y purificación de Microcinas, en un ejemplo en el que se detalla la técnica seguida en la preparación de este compuesto. - - - - -
- 20.

Ejemplo 1

- Los cultivos de la cepa "E. coli 15" se realizan en "medio mínimo con glucosa" que contiene por litro: $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$
25. 2 g; K_2HPO_4 9,06 g; KH_2PO_4 4,53 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,0005 g;

MgSO_4 0,2 g y Glucosa 2 g. Todo ajustado a pH 7, con una agitación de 200 rpm y a una temperatura de 37°C. - - - -

- Los cultivos se llevan a cabo en matraces de 2 litros en los que se coloca 1 litro de medio de cultivo. Cada matraz se inocula con 0,1 ml de preinóculo con una densidad óptica de 0,9 unidades de Absorbancia medida a 660nm con un espectrofotómetro "SPECTRONIC" en una cubeta constituida por un tubo de 1 cm de diámetro. Cuando los matraces así inoculados alcanzan una densidad óptica de 0,9 a 660 nm se
5. recogen los cultivos y se reúnen para su tratamiento posterior. - - - - -
- 10.

Los cultivos anteriores se centrifugan a 18000 g durante 10 minutos, recogiendo los sobrenadantes que se presentan libre de bacterias. - - - - -

15. El sobrenadante precedente de la etapa anterior se concentra a vacío a 45°C hasta un volumen final 1/20 del inicial, con lo que nos queda un volumen de 500 ml de una solución de color amarillento y muy cargada de sales. - - -

20. Al concentrado anterior se le añade metanol en la proporción 5:1. Se obtiene así un precipitado salino prácticamente inactivo que se elimina por centrifugación o filtración, obteniéndose una solución acuosometanólica prácticamente exenta de sales. Esta solución se concentra a vacío hasta sequedad, redisolviéndose en H_2O destilada hasta
25. un volumen equivalente a 1/500 del volumen del cultivo, con

lo que queda un volumen final de 20 ml con una actividad anti-
biótica de 2000 U. A/ml. - - - - -

5. Los 20 ml de producto activo se filtran a través de una membrana de Pellicon PSAC 02510 o equivalente utilizando una célula de Amicón de 10 ml con una presión de nitrógeno de 4 Kg/cm², con lo cual se eliminan productos de un peso molecular superior a 1000. El filtrado contiene el producto activo y el rendimiento es prácticamente cuantitativo, habiéndose comprobado su acción antibacteriana frente a cepas de -
10. E. coli K 12. - - - - -

15. A la solución conteniendo el producto activo obtenido en la etapa anterior se le añade carbón activo al 5% peso/volumen. Se agitan durante 15 minutos centrifugándose o filtrándose para eliminar el carbón. El sedimento de carbón se resuspende en H₂O y se elimina de nuevo el carbón por centrifugación o filtración. - - - - -

20. La solución que se obtiene libre ya de carbón se concentra a vacío a 20 ml, presentándose como una solución incolora conteniendo el producto activo. Esta solución se calienta a 100°C durante 30 minutos para inactivar impurezas termosensibles sin pérdida de su actividad antimicrobiana.-

25. El proceso de purificación se inicia a partir del concentrado 500 veces, previamente tratado como se describe anteriormente. Este concentrado se ha analizado en cuanto a su contenido en aminoácidos con el siguiente resultado.- -

TABLA IV

ANÁLISIS DE LOS AMINOÁCIDOS CONTENIDOS EN EL SOBRENADANTE
DEL CALDO DE CULTIVO DEL "E. COLI 15".

(Se emplean concentrados x 500 tratados por carbón activo)

	<u>µg/ml</u>
5. Valina	1,44
Leucina	0,83
Isoleucina	0,78
Metionina	0,30
10. Tirosina	0,22
Fenilalanina	0,20

Indicios de: Glicina, Alanina, Estanolamina, Lisina.

Se prepara una columna de vidrio 40 x 4 cm de diámetro, rellena con Dowex 50WX4 forma H⁺, de 200 a 400 mallas, con un volumen aproximado de 600 ml. - - - - -

15. Primeramente se equilibra la resina en forma H⁺ pasando 1.500 ml de CH₃COOH 0,1M, y a continuación se pasan los 20 ml de la muestra, la cual previamente ha sido puesta a pH con CH₃COOH concentrado. Se continúa pasando 1000 ml del mismo eluyente con que fue equilibrada la columna y seguidamente a la velocidad aproximada de unas 12 gotas por minuto se pasa H₂O destilada recogiendo fracciones de 20 ml. La actividad antibiótica se fija a la columna no se-

20.

liendo con el primer eluyente (ClH 1 mM), pero sí con el H₂O, comenzando a salir después de pasar 300 ml de ésta y saliendo prácticamente en su totalidad en los 250 ml siguientes. - - - - -

5. Las fracciones activas se juntan y se llevan a sequedad por liofilización. En este primer paso se recupera aproximadamente un 95% de la actividad antibiótica. - - - - -

10. Se continúa la purificación utilizando una columna de menores dimensiones, 50 x 2,5 cm cargadas con resina Dowex 1 x 8 forma Cl⁻ utilizando un volumen de resina de 120 ml. La resina se equilibra en forma Cl⁻ con ClH 1N. A continuación se pasa H₂O hasta que el pH del eluyente que sale de la columna sea 6. Entonces se pasa por la columna el liofilizado del paso anterior redisolto en H₂O y a pH 6. Se pasan 500 ml de H₂O. - - - - -

La muestra así tratada queda retenida en la columna, comenzando a eluirse de la misma después de haber pasado 250 ml de ClH 10 mM y recuperándose completamente en los 100 ml siguientes. - - - - -

20. Los 100 ml de eluyentes con actividad antibiótica se concentran a 10 ml en vacío y a baja temperatura. - - - - -

A continuación el concentrado se trata con Amberlita MB-58 forma (OH) utilizándose una columna de las mismas dimensiones que en el caso anterior. - - - - -

La resina se equilibra en la forma OH^- mediante el paso de 500 ml de NH_4OH 10 mM. Después de haber pasado esta cantidad, se pasa la muestra (a unas 12 gotas por minuto - aproximadamente) que previamente ha sido puesta a pH 10 con NH_4OH . Se continúa pasando 500 ml de NH_4OH 10 mM. En este caso la actividad no es retenida por la resina saliendo con los 500 ml últimos. Estos 500 ml en los cuales se encuentra la actividad se llevan a sequedad por liofilización, con lo cual se elimina el NH_4OH . - - - - -

5.

10.

A continuación se prepara una columna de 70 x 3 cm con 300 ml de Silicagel Merck Tipo 60, equilibrando con Butanol-Acético-Agua en la proporción 12-3-5. - - - - -

La muestra del paso anterior liofilizada se redisuelve en 10 ml de la mezcla de Butanol-Acético-Agua 12-3-5. Se añade esta solución de la muestra a la columna y se pasa a continuación el eluyente (Butanol-Acético-Agua), recogiendo se fracciones de 10 ml. De cada 5 fracciones se lleva una a sequedad y una vez redisuelta en agua se ensaya la actividad antibiótica. Esta sale entre las fracciones 60 y 70, o sea, en 100 ml. Se reúnen estas fracciones llevándolas a sequedad por liofilización obteniéndose un residuo sólido que contiene la sustancia activa, denominada "Microcina 15" y cuyo espectro antimicrobiano se ha expuesto anteriormente.

15.

20.

25.

Para ver el grado de purificación que se va obteniendo por los distintos pasos, se realizan cromatografías bidimensionales ascendentes en capa fina con Silicagel HF₂₅₄ uti

lizando como eluyentes: Butanol-12-Acético-3-Agua-5 para -
la primera y Etanol-75-Amónico-2-Agua-25 para la segunda.-

5. El residuo sólido obtenido después del último paso de purificación, presenta una sola mancha cromatográfica - puesta de manifiesto con los vapores de yodo y mediante la luz ultravioleta (254 y 380 nm). Asimismo, con ninhidrina se pone de manifiesto la ausencia de aminoácidos y/o compues-
tos aminados primarios contaminantes. - - - - -

10. Esta única mancha cromatográfica, eluida del Silica- gel, presenta una intensa actividad, designándose la substan-
cia activa con la denominación de "Microcina 15". - - - -

Método semicuantitativo de valoración del poder antibiótico.

15. Se preparan placas de Petri de 10 cm de diámetro con-
teniendo una capa base de medio mínimo solidificado con el 15^o/oo de agar bacteriológico y una capa siembra de 3 ml del mismo medio nutritivo solidificado con el 7^o/oo de agar y sembrado con el germen de ensayo, 0,1 ml de un cultivo de -
12 horas de un Escherichia coli cepa 405. - - - - -

20. La muestra a valorar se prepara realizando dilucio-
nes sucesivas a 1/2 y con 20 µl de cada una de ellas se car- gan discos de papel que se colocan sobre la superficie de -
las placas de Petri. - - - - -

Tras 18 horas de incubación, la aparición de halos de innibición dará una idea aproximada de la actividad del

producto de ensayo. - - - - -

Se admiten por definición que la máxima dilución - que presente halo de inhibición apreciable contiene una undad arbitraria (U.A.) de actividad biológica. Por tanto el

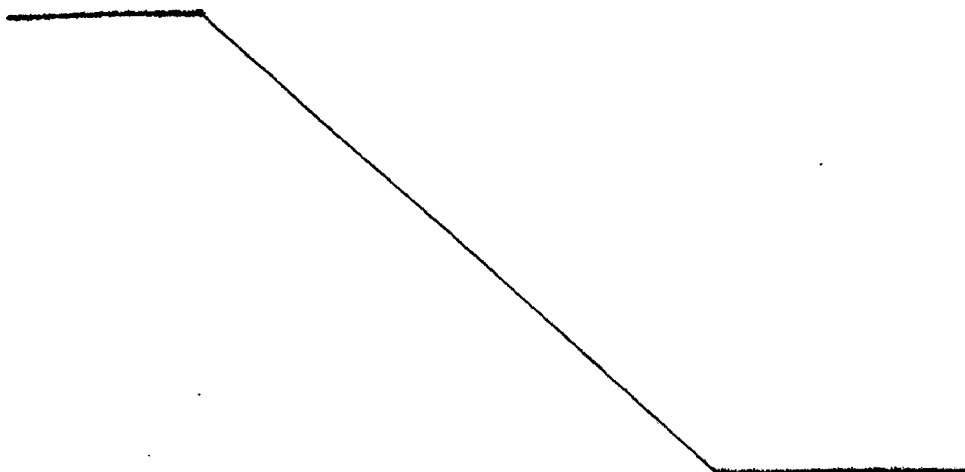
5. factor de dilución correspondiente a esa muestra expresará el nº de unidades arbitrarias por ml de solución problema.-

Habiendo descrito convenientemente un ejemplo de realización de la invención, debe hacerse constar que el mismo tiene carácter ilustrativo y no limitativo y que se podrán

10. introducir cuantas variantes de detalle la experiencia y la práctica puedan aconsejar, siempre que con ello no se desvirtúe la esencialidad de la presente invención, que es la que se resume y concreta en la siguiente. - - - - -

A los efectos consiguientes se declaran de novedad

15. y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las reivindicaciones que siguen. - - - - -



REIVINDICACIONES

5. 1.- Procedimiento de obtención de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano (microcinas), caracterizado porque se aíslan productos del metabolismo de microorganismo gram negativos, de peso molecular inferior a 1.000, obtenidos mediante el cultivo en un medio mínimo constituido por glucosa y sales minerales. - - - - -

10. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dichas sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano se aíslan del caldo de cultivo al que son excretadas durante la fermentación y no a partir de las células bacterianas. - - - - -

15. 3.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el caldo de cultivo se filtra o centrifuga para eliminar las bacterias, se concentra y se trata con metanol, obteniéndose una solución acuoso-metánolica que se filtra para eliminar las sustancias de peso molecular superior a 1000, se trata con carbón activo que retiene las impurezas y se calienta para eliminar impurezas -
20. termosensibles, conservándose la actividad de las sustancias antibióticas mantenidas en la disolución. - - - - -

4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque la concentración del caldo de cultivo fil-

trado y centrifugado se hace a 1/20 de su volumen original.

5.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque el tratamiento con metanol se realiza con cinco veces su volumen de metanol. - - - - -

5. 6.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque el filtrado de la solución acuoso-metanolica se realiza con una membrana Pellicon PSAC 02510 o de similares características. - - - - -

10. 7.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque el tratamiento con carbón activo se realiza con carbón activo entre 1 y 10% p/v. - - - - -

8.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque el calentamiento para eliminar impurezas termostensibles se ejecuta a 100°C durante 30 minutos. - - - - -

15. 9.- "PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE SUSTANCIAS INHIBIDORAS DEL CRECIMIENTO BACTERIANO". - - - - -

Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de dieciocho hojas, foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

