

1 La presente invención se refiere a una preparación
de timidina-fosforilasa para incorporación en medios de
cultivo usados para ensayar la susceptibilidad de bacterias
a agentes antimicrobianos antifolato tales como sulfameto-
5 zazol (SMX) y/o trimetropin (TMP), y en particular se re-
fiere a una preparación perfeccionada de timidina-fosfori-
lase estabilizada.

 Se ha sabido desde hace un cierto número de años
que los medios de cultivo de uso común son a menudo inadecuados
10 para determinar la sensibilidad de bacterias a sulfonamidas o trimetoprim, es decir, agentes que interfieren
con la síntesis de folatos en estos organismos. Esta falta
de idoneidad se manifiesta dando puntos finales de larga
amortiguación cuando se usa el método de dilución en serie,
15 y por un crecimiento parcial dentro de las zonas de inhibi-
ción cuando se emplea el método de difusión. Se ha mostrado
por Bushby, Med.J.Austr.Special Supplement, 1973, 1, 10, y
Kock y Burchall, Applied Microbiology, 1971, 22, 812, que
la timidina es un agente inversor muy potente de las acti-
20 vidades inhibitoras de las sulfonamidas y el trimetoprim.

 En 1945, Harper y Cawston, J.Path.Bact. 57, 59;
mostraron que cuando se añadía sangre de caballo sometida
a lisis, a un medio de ensayo de susceptibilidad deficiente,
podía convertirlo en satisfactorio. Desde este trabajo an-
25 tiguuo, y el de varios otros investigadores, se ha converti-
do en práctica común la inclusión de sangre de caballo so-
metida a lisis en medios de ensayo de susceptibilidad an-
tibacteriana, para reducir el crecimiento parcial que se
observa a menudo dentro de las zonas de inhibición produ-
cidas por las sulfonamidas. Más recientemente se ha mostra-

1 do que este método es también similarmente eficaz en ensa-
yos respecto al trimctoprim (Bushby, Postgraduate Med.J.,
1969, 45 10; y Darrel y otros, J.Clin.Path., 1968, 21, 202).

5 Harper y Cawston establecieron que la sangre de ca-
ballo sometida a lisis contenía un factor que neutraliza
las sustancias antagonistas de sulfonamida, y que éste, lla-
mado Factor Harper-Cawston, solo es eficaz con medios que
contienen un nivel moderado de timidina, es decir, de apro-
ximadamente 0,1 a 15 $\mu\text{g/ml}$. Por debajo de aproximadamente
10 0,1 $\mu\text{g/ml}$ no hay antagonismo a la actividad de las drogas,
y de esta manera la eliminación de una cantidad tan pequeña
de timidina no tiene efecto sobre la inhibición observada
de la droga. A niveles muy altos de timidina, es decir, más
de aproximadamente 15 $\mu\text{g/ml}$, la actividad del factor Har-
per-Cawston no es suficiente para superar la inversión de
15 las actividades de las sulfonamidas y trimetoprim, posible-
mente debido a que la alta concentración de timina produci-
da, como resultado de la escisión de la timidina, puede
reemplazar a la timidina, mucho más activa, en la invención.

20 Se ha indicado que el factor Harper-Cawston es ti-
midina-fosforilasa (Bushby, en Trimethoprim/Sulphamethoxa-
zole (Trimetropim/Sulfametoxazol), en Bacterial Infections:
A Wellcome Foundation Symposium (Infecciones bacterianas:
Simposio de la Fundación Wallcome), ed. Bernstein & Salter,
25 Churchill Livingstone, Edimburgo y Londres, 1973, 1, 10-18;
Ferone y otros, Antimicrobial Agents and Chemotherapy (1975),
7, 91). Se ha señalado en la primera referencia que "aunque
la timidina interfiere con la actividad in vitro de trime-
tropim/sulfametoxazol, no está usualmente presente en los
30 animales en concentraciones suficientemente altas para afec

1 tar a la actividad en vivo".

Las desventajas de incluir sangre de caballo sometida a lisis en un medio de cultivo son que comunica al medio un color pardo rojizo, y que el requisito de añadirla a medios de cultivo bacteriano significa que los medios son virtualmente imposibles de definir. Otra desventaja de usar sangre de caballo estéril es que está disponible comercialmente en cantidad muy limitada, y solo de muy pocos suministradores mundialmente.

10 Ya está establecido que la adición de la enzima timidina-fosforilasa aislada y purificada, de origen bacteriano, a amplia variedad de medios de cultivo comúnmente usados, perfecciona a esos medios en cuanto a ensayos de susceptibilidad de bacterias a las drogas anti-folato,

15 como se expone en la solicitud de patente española Nº 444.643. Sin embargo, el uso práctico de la enzima está limitado por las formas en que se ha sabido que es estable. Es sabido por la técnica anterior que las soluciones de timidina-fosforilasa de origen bacteriano son estables a -20°C,

20 pero a 4°C la actividad disminuye a velocidad significativa. Así, para superar esta dificultad, la solicitud de patente antes mencionada describe formulaciones estables de la enzima que comprende suspensiones en sulfato amónico o soluciones concentradas, pero no diluidas (> 5 mg de proteína/ml), de la enzima en sulfato amónico al 10% (Schwartz, Eur.J.Biochem. (1971), 21, 191). Sin embargo, hay un cierto número de desventajas asociadas con estos tipos de formulación. Por ejemplo, las suspensiones sedimentan rápidamente, son difíciles de dosificar cuantitativamente, y también son difíciles de esterilizar sin desnaturalizar la enzima,

25

30

1 ya que no se pueden usar métodos de filtración. Las solucio-
nes concentradas de la enzima en sulfato amónico al 10% son
desventajosas, no solo por su coste y por el riesgo de con-
taminación microbiana por envases de usos múltiples, sino
5 también debido a que, a las concentraciones con que se con-
sigue una estabilidad razonable (~ 2.000 U.I./ml), 1 ml de
la enzima puede tratar aproximadamente 100 litros de medio.
Por estas razones, era deseable descubrir condiciones bajo
las que esta enzima fuese estable en solución diluida, así
10 como concentrada.

Un análisis cinético de timidina-fosforilasa puri-
ficada a partir de Escherichia coli sugirió que bajo ciertas
condiciones la timina, el fosfato y la timidina-fosforilasa
pueden formar un complejo de vía muerta, es decir, un com-
15 plejo que por sí mismo no es catalíticamente activo, pero
cuya formación ha de ser invertida antes de que la enzima
pueda formar complejos catalíticamente activos. Este hallaz-
go sugirió que el complejo de vía muerta pudiera ser más es-
table que la enzima libre. Dado que la timina es un aditivo
20 indeseable para los medios, como se ha explicado antes, se
buscaba un sustituto de ella.

Se ha hallado ahora que una combinación de uraci-
lo y fosfato inorgánico, por ejemplo fosfato potásico, es un
estabilizador muy eficaz de la timidina-fosforilasa, en so-
25 luciones tanto concentradas como diluidas.

Según un aspecto de la invención, se proporciona
una preparación de timidina-fosforilasa estabilizada que con-
tiene uracilo y fosfato inorgánico.

La timidina-fosforilasa a usar en la presente in-
30 vención se puede obtener por purificación a partir de un

1 cierto número de bacterias, tales como Salmonella typhimurium, Bacillus cereus, Bacillus stearothermophilus, Haemophilus influenzae, y particularmente de una cepa de Escherichia coli que requiere timina y metionina para su crecimiento. La purificación se puede efectuar por el método descrito por Schwartz, Eur.J. Biochem. (1971), 21, 191-198, método que implica un procedimiento algo largo, de precipitación, fraccionamiento, cromatografía y diálisis. Un procedimiento más preferido es el descrito en la solicitud de

5

10 patente española Nº 444.643, solicitud que expone que cierta cepa de E. coli produce cantidades desproporcionadas de timidina-fosforilasa bajo condiciones apropiadas de crecimiento, y que se puede aislar y purificar aplicando el extracto de células a adsorbentes específicos y eluyéndola de

15 allí, dando un rendimiento y pureza mucho mayores que el método de Schwartz.

La vigilancia de los eluidos en todas las etapas del procedimiento de purificación empleado se puede efectuar usando una determinación espectrofotométrica a una longitud de onda seleccionada, para establecer la actividad enzimática, que se expresa en unidades internacionales (U. I.), siendo una unidad internacional equivalente a la cantidad de enzima que fosforiliza un micromol de timidina a timina, bajo las condiciones de determinación usadas (véase Ejemplo 1). Se eligen los picos que muestran la concentración y pureza máximas.

20

25

La enzima purificada como antes se deja dispuesta luego, como se ha indicado anteriormente, en una forma estable por adición de una combinación de uracilo y fosfato inorgánico. Aunque se puede usar una variedad de sales fos-

1 fato, se prefieren el fosfato potásico o amónico.

La concentración de timidina-fosforilasa incorporada en los medios está comprendida preferiblemente entre aproximadamente 0,01 y 1.000 unidades internacionales/ml, y
5 más preferiblemente entre 0,02 y 10 unidades internacionales/ml.

Los límites de concentración útiles para que el uracilo y fosfato produzcan una preparación estabilizada de timidina-fosforilasa son 0,5 mM hasta saturación, preferi-
10 blemente 1 a 20 mM, para el uracilo, y 0,1 mM hasta saturación, preferiblemente 0,1 a 1,0 M, para el fosfato inorgánico.

En ciertos casos, la filtración de la formulación de enzima tendrá como resultado una pérdida de actividad en-
15 zimática. Sin embargo, se ha hallado que la adición de albúmina de suero, por ejemplo albúmina de suero bovino, superó esta dificultad.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una preparación estabilizada de timidina-fos-
20 forilasa que contiene uracilo y fosfato, a la que se añade albúmina de suero para evitar la pérdida de actividad enzimática por filtración.

La albúmina de suero se añade preferiblemente a una concentración de 0,2 a 5%.

25 La esterilidad de las formulaciones antes descritas tiene gran importancia, en vista de su aplicación al en-
sayo de las sensibilidades de las bacterias a los antifolatos. Por tanto, a menudo es deseable añadir un agente antimicrobiano a la formulación, para asegurar la esterilidad.

30 Sin embargo, es importante que los antimicrobianos emplea-

1 dos sean capaces de esterilizar la formulación sin afectar
a la estabilidad de la enzima. Se ha hallado que las azidas
de metal alcalino, tales como la azida sódica o azida potás-
sica, son antimicrobianos excelentes para los fines de la
5 presente invención, ya que no interfieren con la actividad
enzimática, y en el uso de las formulaciones de la presente
invención son diluidas hasta ser ineficaces como agentes an-
timicrobianos.

10 Según aún otro aspecto de la presente invención,
se proporciona una preparación estabilizada estéril de ti-
midina-fosforilasa que contiene una combinación de uracilo
y fosfato, y un agente antimicrobiano que es capaz de este-
rilizar a dicha preparación sin afectar a la estabilidad
de la enzima.

15 El agente antimicrobiano, según se ha definido an-
tes, se puede incorporar en la preparación a una concentra-
ción de 0,001 a 0,4%, preferiblemente 0,002 a 0,2%.

20 Se ha hallado además que la estabilidad de la ti-
midina-fosforilasa en la preparación, según se ha descrito
antes, es función del pH, consiguiéndose la mayor estabili-
dad en el intervalo de pH 6 a pH 8, más preferiblemente pH
7.

25 Las formulaciones de timidina fosforilasa prepara-
das de la manera de la presente invención hacen posible un
fácil envasado estéril de cantidades de enzima que están
dentro del campo de lo práctico, para uso en tratamiento
de medios en laboratorios de diagnóstico individual.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención, pe-
ro no están destinados a limitarla en modo alguno.

1 EJEMPLO 1

Se efectuó un experimento para investigar la estabilidad de preparaciones de timidina-fosforilasa que contienen diversas concentraciones iniciales de enzima que había sido purificada a partir de E. coli y estabilizada con sulfato amónico. Cada solución de enzima contenía sulfato amónico (700 mM), tampón de fosfato potásico (83 mM) y albúmina de suero bovino (2,5%), a pH 6,8. La actividad enzimática se vigiló a 25°C y 290 nm ($\Delta E = 1000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), y a 200 mM de fosfato potásico, pH 7,4 y 1 mM de timidina. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Timidina-fosforilasa (U.I./ml iniciales)	% de la actividad original tras 110 días a 5°C
1300	98
400	90
40	79
4	40
0,4	3

20 Como se puede ver por lo anterior, esta formulación, según la solicitud de patente española Nº 444.643, solo estabiliza eficazmente la preparación de timidina-fosforilasa a concentraciones relativamente altas de la enzima.

25 EJEMPLO 2

Se efectuó un experimento para investigar la estabilidad de una preparación de timidina-fosforilasa purificada a partir de E. coli en solución diluida (1,5 U.I./ml) y que o bien se dejó sin estabilizar, o se estabilizó con diversas combinaciones de uracilo y fosfato, y uracilo o

1 fosfato solos, a diversos valores del pH. Cada solución con
 tenía también albúmina de suero bovina (2,5%) y azida sódica
 (0,02%). De nuevo, la actividad enzimática se vigiló como
 en el Ejemplo 1. Se obtuvieron los resultados siguientes:

5

Estabilizadores añadidos	% de la actividad original ⁺ tras 32 días a 37°C		
	pH 6	pH 7	pH 8
Ninguno	0	0	0,6
500 mM fosfato	43	72	70
10 17,5 mM uracilo	19	1	0,9
17,5 mM uracilo y 500 mM fos- fato	100	100	93
0,5 mM uracilo y 500 mM fos- fato	-	85	-

⁺ = 1,5 U.I./ml

15 Como se puede ver por lo anterior, el uracilo solo,
 o el fosfato potásico solo, no son eficaces para estabilizar
 la enzima como su combinación. Además, esta combinación es
 mucho más eficaz con bajas concentraciones de enzima que
 la formación usada en el Ejemplo 1.

20

25

30

1

REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Método para la obtención de una preparación de timidina-fosforilasa estabilizada, caracterizado porque una timidina-fosforilasa se estabiliza por interacción con uracilo y un fosfato inorgánico.

15

2ª.- Método según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el fosfato inorgánico está presente en el intervalo de concentración de 0,1 mM hasta saturación.

3ª.- Método según la reivindicación 2ª, caracterizado porque el fosfato inorgánico está presente en el intervalo de concentración de 0,1 M hasta 1,0 M.

20

4ª.- Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el fosfato inorgánico es fosfato potásico.

25

5ª.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª, caracterizado porque el fosfato inorgánico es fosfato amónico.

6ª.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 5ª, caracterizado porque el uracilo está presente en el intervalo de concentración de 0,5 mM hasta saturación.

30

7ª.- Método según la reivindicación 6ª, caracte-

210678

1 rizado porque el uracilo está presente en el intervalo de
concentración de 1 mM hasta 20 mM.

5 8ª.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 7ª, caracterizado porque la preparación también comprende albúmina de suero.

9ª.- Método según la reivindicación 8ª, caracterizado porque la albúmina de suero es albúmina de suero bovino.

10 10ª.- Método según la reivindicación 8ª ó 9ª, caracterizado porque la albúmina de suero está presente en el intervalo de concentración de 0,2 a 5%.

11ª.- Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la preparación comprende también un agente antimicrobiano.

15 12ª.- Método según la reivindicación 11ª, caracterizado porque el agente antimicrobiano es una azida de metal alcalino.

20 13ª.- Método según la reivindicación 12ª, caracterizado porque la azida de metal alcalino está presente en el intervalo de concentración de 0,001 a 0,4%.

14ª.- Método según la reivindicación 13ª, caracterizado porque la azida de metal alcalino está presente en el intervalo de concentración de 0,002 a 0,2%.

25 15ª.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 11ª a 14ª, caracterizado porque el agente antimicrobiano es azida sódica.

16ª.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 11ª a 14ª, caracterizado porque el agente antimicrobiano es azida potásica.

30 17ª.- Método según cualquiera de las reivindicaciones

1 nes precedentesm caracterizado porque el pH de la prepara-
ción está comprendido entre pH 6 y pH 8.

18ª.- Método según la reivindicación 17ª, caracte-
rizado porque el pH de la preparación es pH 7.

5 19ª.- Método según cualquiera de las reivindicacio-
nes precedentes, caracterizado porque la preparación se
encierra en un envase estéril.

20ª.- Método para la obtención de una preparación
de timidina-Fosforilasa estabilizada.

10 Tal y como se ha descrito en la Memoria que ante-
cede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de DOCE hojas escritas a má-
quina por una sola cara.

Madrid, 27 JUN 1978

15

P.A.

Fernando de Elzaburu
Por Poder

20

25

30
210678
VAL