

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA
Registro de la Propiedad Industrial



Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

(10) ES	(11) NUMERO	(10) AT
(21)	487046	
(22)	19 DIC. 1979	

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO		
78 35 649	19 Diciembre 1978	Francia
C12D 13/po, A61K 39/p2, 45/po, C12K 5/po		

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
		- - -

(64) TITULO DE LA INVENCION
"Procedimiento de preparación de proteoglicanos membranares bacterianos purificados"

(71) SOLICITANTE (S)
PIERRE FABRE S.A.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
125, rue de la Paisanderie, 75 Paris 16, Francia

(72) INVENTOR (ES)
Lucien Dussourd d'Hinterland, Gérard Normier, Anne-Marie Pinel y Jacques Durand

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE
M. Curall Sufol

330 536 D 9338
EX-FR

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

por VEINTE años

solicitada en España a favor de PIERRE FABRE S.A., de nacionalidad francesa, domiciliada en 125, rue de la Faisanderie, 75 París 16, Francia, por "Procedimiento de preparación de proteoglicanos membrenarios bacterianos purificados", con prioridad de la solicitud francesa 78 35 649 de fecha 19 di ciembre 1978. - - - - -

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a unos proteoglicanos membrenarios bacterianos purificados y destoxificados y, en su aspecto reivindicado, se refiere, en particular a un procedimiento para su preparación como adyuvante de inmunidad en las vacunas. - - - - -

5.

Es preciso recordar que las vacinas están, en general, constituidas por uno o varios elementos inmunógenos,

es decir susceptibles de hacer aparecer una reacción inmunitaria. - - - - -

5. En ciertos casos, sin embargo, los elementos inmunógenos son incapaces de desarrollar solos su poder inmunogénico, o bien lo desarrollan solamente en un grado extremadamente débil, es preciso entonces recurrir a productos denominados "adyuvantes de inmunidad". - - - - -

10. Los adyuvantes de inmunidad son clásicamente unos productos que tienen una actividad inmunoestimulante sin ser inmunógenos por sí mismos; se puede citar por ejemplo el adyuvante de Freund incompleto (IFA) que está compuesto por 85% de parafina y de 15% de naftaleno. - - - - -

15. La presente invención se refiere por tanto a unos adyuvantes de inmunidad útiles en las vacunas y, más particularmente, en las vacunas llamadas ribosomales o a base de ARN. Este tipo de vacunas ribosomales ha sido descrito en particular en la patente francesa no. 73 43957. - - - - -

20. Se trata de vacunas que contienen a título de compuesto inmunógeno, o bien unos ribosomas bacterianos, o bien unos ARN bacterianos que provienen de las bacterias patógenas contra las cuales se desea obtener inmunidad. Sin embargo, como está descrito en la patente precedente, estos compuestos inmunógenos no pueden actuar completamente más que en

Presencia de adyuvantes de inmunidad constituidos por los proteoglicanos membranarios extraídos de membranas de bacterias. - - - - -

5. Sin embargo, los procedimientos conocidos actualmente para la preparación de estos proteoglicanos no permiten una purificación y una destoxificación completas de estos proteoglicanos, lo que puede conducir en ciertos casos a reacciones vacunales o a reacciones pirogénicas que es interesante poder evitar. - - - - -

10. En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento que permite purificar los proteoglicanos a fin de obtener unos proteoglicanos membranarios bacterianos solubles en agua, lo que constituye una ventaja considerable puesto que los proteoglicanos así obtenidos pueden ser esterilizados por filtración, por tanto sin recurrir al calor que podía desnaturalizar sus propiedades. Es por ello por lo que, en el marco de la presente invención, será preciso entender por proteoglicanos purificados unos proteoglicanos solubles en agua. - - - - -

20. Es por ello por lo que la presente invención se refiere a un procedimiento destinado a purificar y a destoxificar los proteoglicanos membranarios bacterianos, unos proteoglicanos membranarios purificados y su aplicación como adyuvante de inmunidad en las vacunas. - - - - -

La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de los proteoglicanos membranarios bacterianos solubles purificados, caracterizado porque comprende por lo menos una etapa de tratamiento de los proteoglicanos brutos en medio acuoso por una base o un hipobromito seguida por la eliminación del exceso de reactivo y del residuo insoluble, hallándose los proteoglicanos purificados en solución acuosa. - - - - -

5.

En un modo de realización del procedimiento según la invención, los proteoglicanos brutos son tratados por un hidróxido alcalino, en particular la sosa, en agua, con una molaridad comprendida entre 0,05 y 2 M, preferentemente 0,1 M, prosiguiéndose el tratamiento algunas horas, por ejemplo 24 horas, a temperatura ambiente, por ejemplo 25°C, y preferentemente bajo agitación. Este tratamiento tiene por efecto hidrolizar de forma controlada los proteoglicanos a fin de extraer de los mismos la fracción soluble. - - - - -

10.

15.

En este modo de realización, a fin de eliminar el exceso de reactivo, el hidrolizado es neutralizado por un ácido tal como el ácido clorhídrico, y la sal así formada es eliminada por ejemplo por diálisis contra agua destilada. Queda entonces un residuo insoluble que se puede eliminar por precipitación, en particular por centrifugación, por ejemplo 45 minutos a 30.000 g y 4°C. - - - - -

20.

25.

El sobrenadante constituye los proteoglicanos solu

bles purificados. - - - - -

5. En un segundo modo de realización del procedimiento según la presente invención, los proteoglicanos brutos en el agua son tratados por un hipobromito alcalino por una duración del orden de algunas decenas de minutos, preferentemente a temperatura ambiente y bajo agitación, y después el hipobromito en exceso puede ser eliminado en particular por diálisis de 24 horas contra agua corriente y después contra agua destilada. - - - - -

10. El residuo insoluble puede ser eliminado como se ha indicado precedentemente. - - - - -

15. El procedimiento según la presente invención comprende además, preferentemente, una etapa de eliminación de los lípidos A por hidrólisis ácida en medio acuoso, preferentemente a temperatura comprendida entre 70 y 100°C, en presencia de aproximadamente 1% de ácido acético glacial por una duración del orden de 90 minutos y eliminación del precipitado formado. - - - - -

20. La presente invención se refiere también, a título de adyuvante de inmunidad en las vacunas, a unos proteoglicanos membranarios bacterianos solubles en agua, purificados, caracterizados porque tienen la composición siguiente en peso: - - - - -

	Hexosas	24-42 %
	Proteínas	31-53 %
	Lípidos	12-18 %
	Hexosaminas	2-6 %
5.	ARN, menos de	0,5 %
	ADN, menos de	0,2 %
	LPS, menos de	0,001 %

Entre estos proteoglicanos, es preciso citar en particular los proteoglicanos que tienen la composición siguiente: -----

	Hexosas	37 ± 5 %
	Proteínas	36,5 ± 5 %
	Lípidos	15 ± 3 %
	Hexosaminas	5 ± 2 %
15.	ARN	<0,5 %
	ADN	≤0,2 %
	LPS	<0,001%

que pueden obtenerse por la realización del procedimiento precedente en el cual se utiliza un hidróxido alcalino. - -

20. Es preciso también mencionar entre los proteoglicanos de la invención los proteoglicanos que tienen la composición siguiente: -----

	Hexosas	29 ± 5 %
	Proteínas	48 ± 5 %
25.	Lípidos	15 ± 3 %
	Hexosaminas	4 ± 2 %
	ARN	<0,5 %
	ADM	≤0,2 %
	LPS	<0,001%

que pueden obtenerse en particular por la utilización del procedimiento precedente en la cual se utiliza un hipobromito. - - - - -

5. A fin de caracterizar las diferentes fracciones, se pueden utilizar los métodos analíticos siguientes: - - -

Hexosas : Por la reacción de la antrosa según SCOTT (T.A.), MELVIN (E.H.) 1953, *Analyt. Chem.* 25, 1956.

Proteínas : por la reacción del Biuret según GORNALL (A.G.), BARDAXILL (C.A.) DAVID (V.V.), 1949, *J. Biol. Chem.* 177,751.

10. Lípidos : por un método gravimétrico basado en una extracción global por disolventes orgánicos.

Hexosaminas : por su reacción con el p. dimetilaminobenzaldehído según MORGAN (W.T.S.) RONDEL (C.J.M.), 1955, *Biochem. J.* 61.

15. ARN : (ácido ribonucléico) : por espectrofotometría u.v. directa a 260 mm y por la reacción con el orcinol según LUSENA (C.V.), 1951, *Canad. J. Biochem.* 29, 107-108.

ADN : (ácido desoxiribonucléico) por la reacción coloreada con la difenilamina según BURTON (K.), 1956, *Biochem. J.* 62,315.

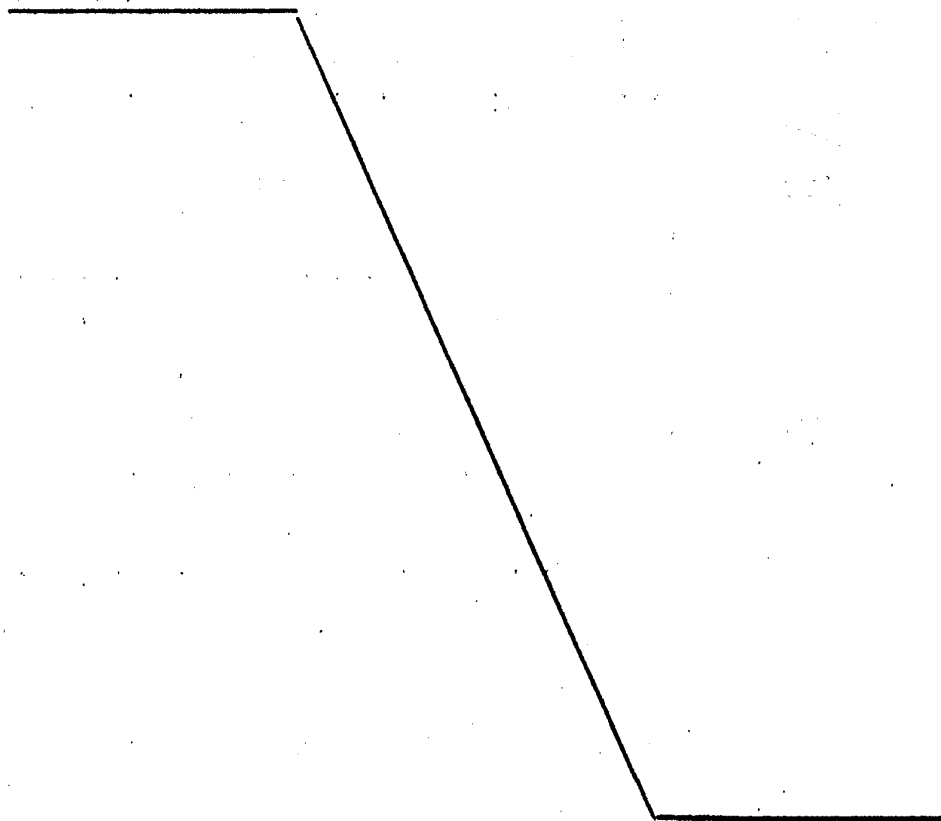
20. LPS (lipopolisacáridos), por la reacción coloreada con la carbocianina descrita por JANDA (J.), WORK (E.), 1971, *FEBS Letters*, vol. 16, no. 4, p. 343-345.

Agua residual : por la reacción de Karl FISCHER.

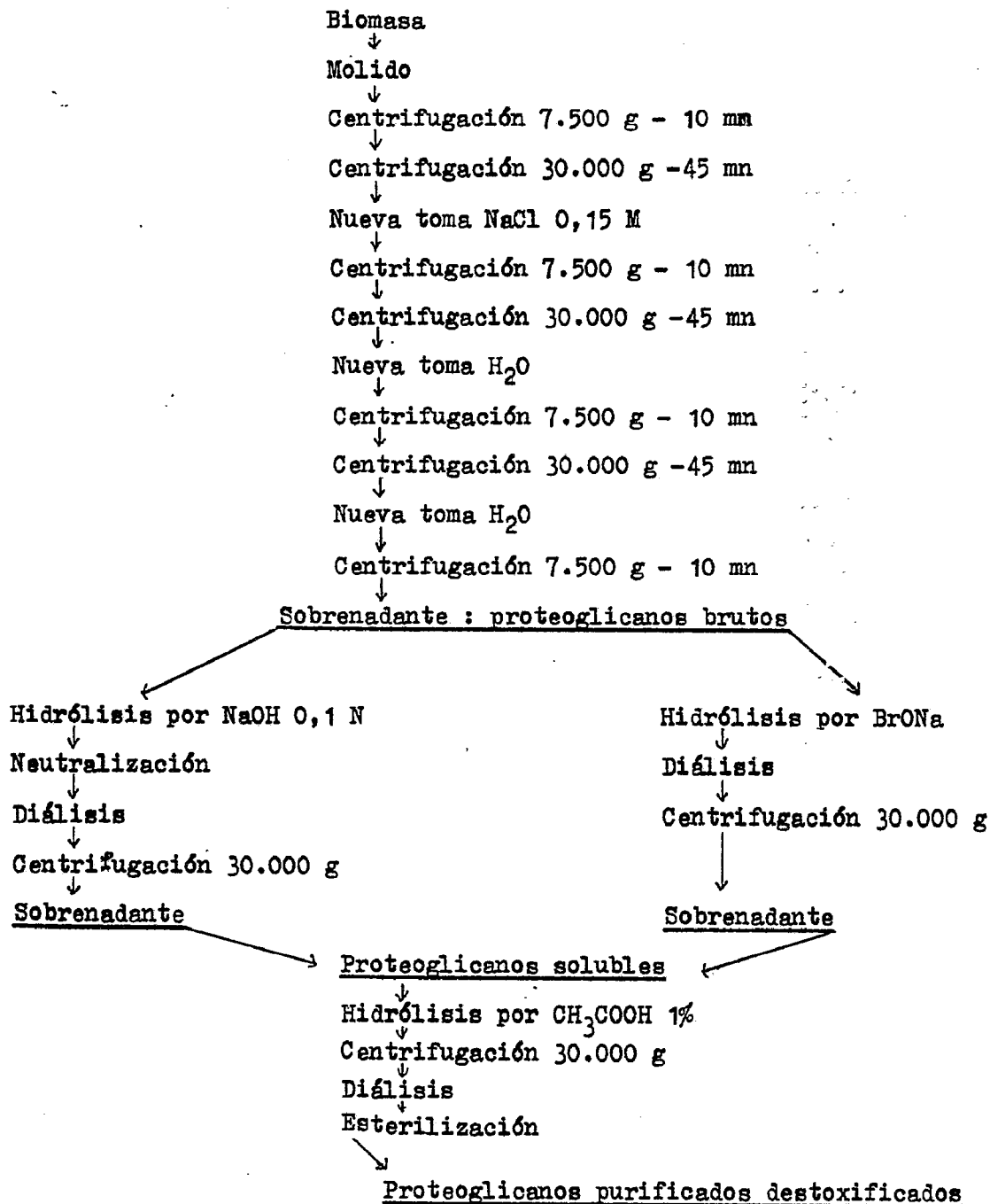
25. En general, los proteoglicanos membranarios brutos pueden ser preparados por cualquier procedimiento conocido, en particular por el procedimiento descrito en la patente men

5. cionada o por centrifugación fraccionada, a partir de una biomasa bacteriana molida, a fin de sedimentar sucesivamente los residuos celulares bajo una aceleración comprendida entre, preferentemente, 7000 y 8000 g durante algunos minutos, después las membranas bajo una aceleración de 20.000 a 40.000 g durante algunas decenas de minutos, y después separación de los proteoglicanos de las membranas por centrifugación fraccionada en solución salina y en agua. - - - - -

10. El esquema siguiente da un ejemplo de obtención de proteoglicanos purificados a partir de una biomasa bacteriana. - - - - -



Representación esquemática de la preparación de los proteoglicanos



Los proteoglicanos membrenarios según la presente invención que son particularmente interesantes se extraen de las membranas de las bacterias gram negativas, en particular de los géneros *Klebsiella*, *Serratia* y *Escherichia* y muy particularmente de: - - - - -

5.

- Klebsiella pneumoniae*
- Serratia marcescens*
- Escherichia coli.*

La presente invención se refiere también a las vacunas que contienen los proteoglicanos membrenarios descritos anteriormente y, en particular, las vacunas que contienen a título de fracción inmunogénica los ribosomas o los ARN extraídos de bacterias patógenas contra las cuales se desea la inmunidad. - - - - -

10.

Los ARN y los ribosomas utilizables en las vacunas según la invención pueden prepararse por procedimientos conocidos, en particular los procedimientos descritos en las patentes francesas 73 43957, 75 10252 y 76 24124. - - - - -

15.

En un modo de realización de este aspecto de la invención, está previsto que la relación en peso entre la fracción inmunogénica y los proteoglicanos de la invención esté comprendida entre 1,4 y 1,6 y preferentemente 1,5. - - - - -

20.

Se pueden citar muy particularmente las vacunas siguientes: - - - - -

1) Vacunas bronco-ORL

a) Asociación Ribosomas-proteoglicanos

- 5.
- ribosomas de *Klebsiella pneumoniae* 3,5 μg
 - ribosomas de *Streptococcus pneumoniae* 3,0 μg
 - ribosomas de *Streptococcus pyogenes* A₁₂ 3,0 μg
 - ribosomas de *Hemophilus influenzae* 0,5 μg
 - Proteoglicanos de *Klebsiella pneumoniae*. 15,0 μg

b) Asociación ARN ribosomal-proteoglicanos

- 10.
- ARN ribosomal de *Klebsiella pneumoniae* 2,45 μg
 - ARN ribosomal de *Streptococcus pneumoniae*. 2,10 μg
 - ARN ribosomal de *Streptococcus pyogenes* A₁₂ 2,10 μg
 - ARN ribosomal de *Hemophilus influenzae* 0,35 μg
 - Proteoglicanos de *Klebsiella pneumoniae*. 10,50 μg

2) Vacunas anti-piorrécicas

15. a) Asociación Ribosomas-proteoglicanos

- ribosomas de *Rothia dentocariosus*. 1,2 μg
- ribosomas de *Actinomyces viscosus*. 1,2 μg
- ribosomas de *Streptococcus mutans*. 0,8 μg
- ribosomas de *Streptococcus salivarius*. 2,0 μg
- 20. - ribosomas de *Lactobacillus casei* 1,2 μg
- Proteoglicanos de *Klebsiella pneumoniae*. 9,6 μg

b) Asociación ARN-ribosomal Proteoglicanos

- 25.
- ARN ribosomal de *Rothia dentocariosus*. 0,84 μg
 - ARN ribosomal de *Actinomyces viscosus*. 0,84 μg
 - ARN ribosomal de *Streptococcus mutans*. 0,56 μg
 - ARN ribosomal de *Streptococcus salivarius*. 1,40 μg
 - ARN ribosomal de *Lactobacillus casei* 0,84 μg
 - Proteoglicanos de *Klebsiella pneumoniae*. 6,72 μg

3) - Vacuna dermatológica anti-acnéica

a) Asociación ribosomas - Proteoglicanos

- ribosomas de *Corynebacterium acnes* 2 μ g
- ribosomas de *Corynebacterium parvum* 2 μ g
- 5. - ribosomas de *Streptococcus pyogenes* 2 μ g
- ribosomas de *Staphylococcus epidermidis* 2 μ g
- Proteoglicanos de *Serratia marcescens* 12 μ g

b) Asociación ARN ribosomal - Proteoglicanos

- ARN ribosomal de *Corynebacterium acnes* 1,4 μ g
- 10. - ARN ribosomal de *Corynebacterium parvum* 1,4 μ g
- ARN ribosomal de *Streptococcus pyogenes* 1,4 μ g
- ARN ribosomal de *Staphylococcus epidermidis* 1,4 μ g
- Proteoglicanos de *Serratia marcescens* 8,4 μ g

4) Vacuna ginecológica

a) Asociación ribosomas-proteoglicanos

- ribosomas de *Escherichia coli* 2 μ g
- ribosomas de *Streptococcus faecalis D* 2 μ g
- ribosomas de *Streptococcus H.* 2 μ g
- ribosomas de *Staphylococcus epidermidis* 2 μ g
- 20. - ribosomas de *Candida albicans* 2 μ g
- Proteoglicanos de *Escherichia coli* 15 μ g

b) Asociación ARN ribosomal-Proteoglicanos

- ARN ribosomal de *Escherichia coli* 1,4 μ g
- ARN ribosomal de *Streptococcus faecalis D* 1,4 μ g
- 25. - ARN ribosomal de *Streptococcus H* 1,4 μ g
- ARN ribosomal de *Staphylococcus epidermidis* 1,4 μ g
- ARN ribosomal de *Candida albicans* 1,4 μ g
- Proteoglicanos de *Escherichia coli* 10,5 μ g

5) Vacuna intestinal, anti-tífica

a) Asociación Ribosomas-Proteoglicanos

- 5. - ribosomas de Bacterium coli. 2 / μ g
- ribosomas de Salmonella paratyphi A. 2 / μ g
- ribosomas de Salmonella paratyphi B. 2 / μ g
- ribosomas de Shigella dysenteriae. 2 / μ g
- ribosomas de Enterococcus. 2 / μ g
- Proteoglicanos de Serratia marcescens. 15 / μ g

b) Asociación ARN ribosomal - Proteoglicanos

- 10. - ARN ribosomal de Bacterium coli. 1,4 / μ g
- ARN ribosomal de Salmonella paratyphi A. 1,4 / μ g
- ARN ribosomal de Salmonella paratyphi B. 1,4 / μ g
- ARN ribosomal de Shigella dysenteriae. 1,4 / μ g
- ARN ribosomal de Esterococcus. 1,4 / μ g
- Proteoglicanos de Serratia marcescens. 10,5 / μ g

15. EJEMPLO 1

Preparación de proteoglicanos membrenarios brutos K. pneumonia

La cepa de K. pneumoniae se cultiva sobre un medio que contiene por litro: - - - - -

- 20. Extracto de carne 5 g
- Extracto de levadura 5 g
- Sacarosa 2 g
- Fosfato disódico 2,5 g

25. Las células son a continuación separadas del medio de cultivo por centrifugación y después son lavadas con una solución salina (NaCl), secadas y eventualmente conservadas a -20°C. - - - - -

La biomasa obtenida por fermentación es concentrada y lavada por centrifugación continua. El concentrado bacteriano así obtenido es dispersado en suero fisiológico para tener una concentración final en células secas de 50 g por litro (medida por espectrofotometría). - - - - -

5.

La suspensión bacteriana es sometida a un molido celular por paso por un homogenizador APV-Manton Gaulin equipado con registros especiales de desintegración. Durante esta operación, la temperatura de la solución es mantenida por debajo de 10°C. - - - - -

10.

Los proteolicanos brutos aislados de este molido celular por una serie de centrifugaciones diferenciales en las condiciones siguientes: - - - - -

- una centrifugación de 10 minutos a 7.500 g y + 4°C permite eliminar las células no molidas y los residuos celulares. El sobrenadante es a continuación sometido a una centrifugación de 45 minutos a 30.000 g y + 4°C para sedimentar la fracción membranaria bruta, - - - - -

15.

- el residuo de 30.000 g es dispersado por medio de un homogenizador en un volumen de NaCl 0,15 M en frío y después sometido al mismo ciclo de centrifugaciones a 7.500 g y 30.000 g que anteriormente, - - - - -

20.

- el residuo 30.000 g es tomado de nuevo esta vez

en un volumen de agua destilada y dispersado hasta homogeneidad perfecta, - - - - -

5. - la suspensión en agua destilada es una vez más sometida a un ciclo de centrifugaciones a 7.500 g y después de 30.000 g y el residuo es tomado de nuevo, esta vez en 1/4 del volumen inicial de agua destilada. La suspensión es centrifugada 10 minutos a 7500 g y el sobrenadante que contiene los proteoglicanos brutos es conservado. - - - - -

EJEMPLO 2

10. Preparación de proteoglicanos purificados

- Al sobrenadante precedente obtenido en el ejemplo 1, que contiene los proteoglicanos brutos, se adiciona 1 ml de hidróxido de sodio (10 N) para 100 ml de sobrenadante a fin de obtener una molaridad final de 0,1 M en NaOH. - - -
15. - Se deja incubar a 25°C durante 24 horas con una agitación moderada a fin de extraer por hidrólisis controlada la fracción soluble de los proteoglicanos. - - - - -
- El hidrolizado es a continuación neutralizado por una solución (3 N) de ácido clorhídrico y el cloruro de sodio formado es eliminado por diálisis contra agua destilada. - -
20. - El residuo insoluble es eliminado después de diálisis por una centrifugación de 45 minutos a 30.000 g y 4°C, el sobrenadante que contiene los proteoglicanos solubles es

conservado. - - - - -

EJEMPLO 3

Preparación de proteoglicanos purificados

5. - Al sobrenadante obtenido en el ejemplo 1, que contiene los proteoglicanos brutos, se adicionan 2 ml de hipobromito de sodio (10 ml de bromo + 60 ml de hidróxido de sodio concentrado) para 100 ml de sobrenadante. - - - - -

- La suspensión es mantenida durante 30 minutos a temperatura ambiente bajo agitación. - - - - -

10. - El hipobromito en exceso es entonces eliminado por una diálisis de 24 horas contra agua corriente y después contra agua destilada. - - - - -

15. - El residuo insoluble después de diálisis es eliminado por centrifugación a 4°C durante 45 minutos a 30.000 g y el sobrenadante que contiene los proteoglicanos solubles es conservado. - - - - -

EJEMPLO 4

20. Los proteoglicanos preparados en el ejemplo 2 no están totalmente destoxificados. Contienen aún pequeñas cantidades de lipopolisacáridos que poseen un efecto hipertermizante. Es por lo que se tratan los proteoglicanos del ejemplo 2 de la manera siguiente: - - - - -

- a 100 ml de sobrenadante dializado, que contiene los proteoglicanos solubles, se adiciona 1 ml de ácido glacial, y después se lleva durante 90 minutos a una temperatura de 90°C. - - - - -

5. Esta hidrólisis separa cuantitativamente el lípido A del LPS y el enfriamiento en hielo provoca su precipitación.

El precipitado de lípido A es eliminado por centrifugación 20 minutos a 30.000 g y 0°C. - - - - -

10. El sobrenadante es recogido y después dializado a 24 horas contra agua destilada para eliminar el ácido acético. - - - - -

El dializado es esterilizado por filtración sobre membranas 0,22 μ y el filtrado es conservado congelado a bien liofilizado. - - - - -

15. Su composición es la siguiente: - - - - -

	Hexosas	37 \pm 5 %
	Proteínas	36,5 \pm 5 %
	Lípidos	15 \pm 3 %
	Hexosaminas	5 \pm 2 %
20.	ARN	<0,5 %
	ADN	\leq 0,2 %
	LPS	<0,001%

EJEMPLO 5

Operando como en el ejemplo 4 a partir de los pro-

teoglicanos purificados del ejemplo 3, se obtienen unos proteoglicanos de la composición siguiente: - - - - -

5.	Hexosas	29 ± 5 %
	Proteínas	48 ± 5 %
	Lípidos	15 ± 3 %
	Hexosaminas	4 ± 2 %
	ARN	0,5 %
	ADN	0,2 %
	LPS	0,001%

10. Desde luego, operando de la misma manera a partir de *Serratia marcescens* y de *Escherichia coli* se obtienen los proteoglicanos purificados y destoxificados que pueden ser utilizados en las composiciones descritas anteriormente. - -

15. Las formulaciones de vacunas según la invención pueden ser acondicionadas con los soportes y excipientes conocidos en este campo según su modo de aplicación, las composiciones que han sido dadas anteriormente son preferentemente formas inyectables. - - - - -

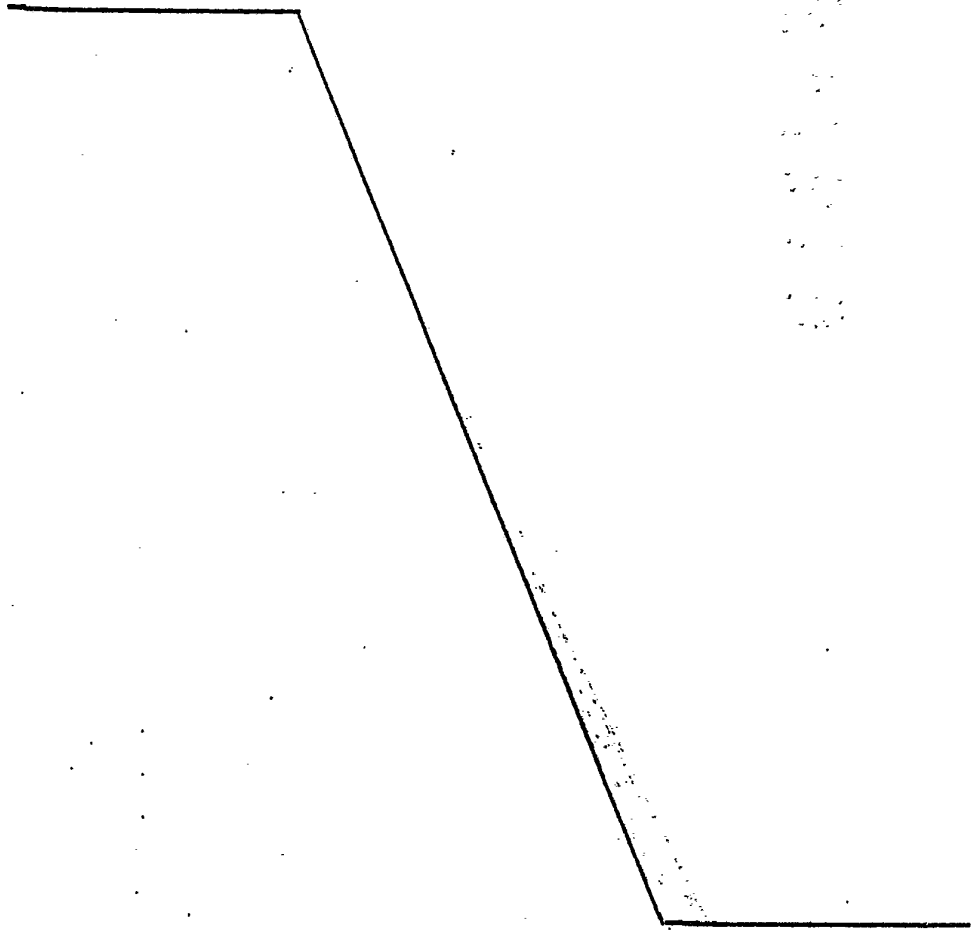
20. Las vacunas según la presente invención han sido ensayadas para su actividad inmunógena y se ha constatado una actividad sensiblemente mejor que la de las vacunas descritas en la patente 73 43957 debida al reemplazado de los proteoglicanos membranaarios por unos proteoglicanos membranaarios purificados y destoxificados. Pero el aspecto más ventajoso de las vacunas según la presente invención es su ausencia de efecto pirógeno. - - - - -

25.

Un estudio de efecto pirógeno ha sido realizado de la forma siguiente: - - - - -

5. Se inyecta por vía intravenosa una dosis de vacuna en 1 ml de agua por conejo de 2 a 2,5 kg y se observa la temperatura rectal por sonda con termopar, los resultados observados están dados en la tabla I. - - - - -

Se constata que las vacunas según la presente inyección están exentas de efecto pirógeno. - - - - -



EFEECTO PIROGENO

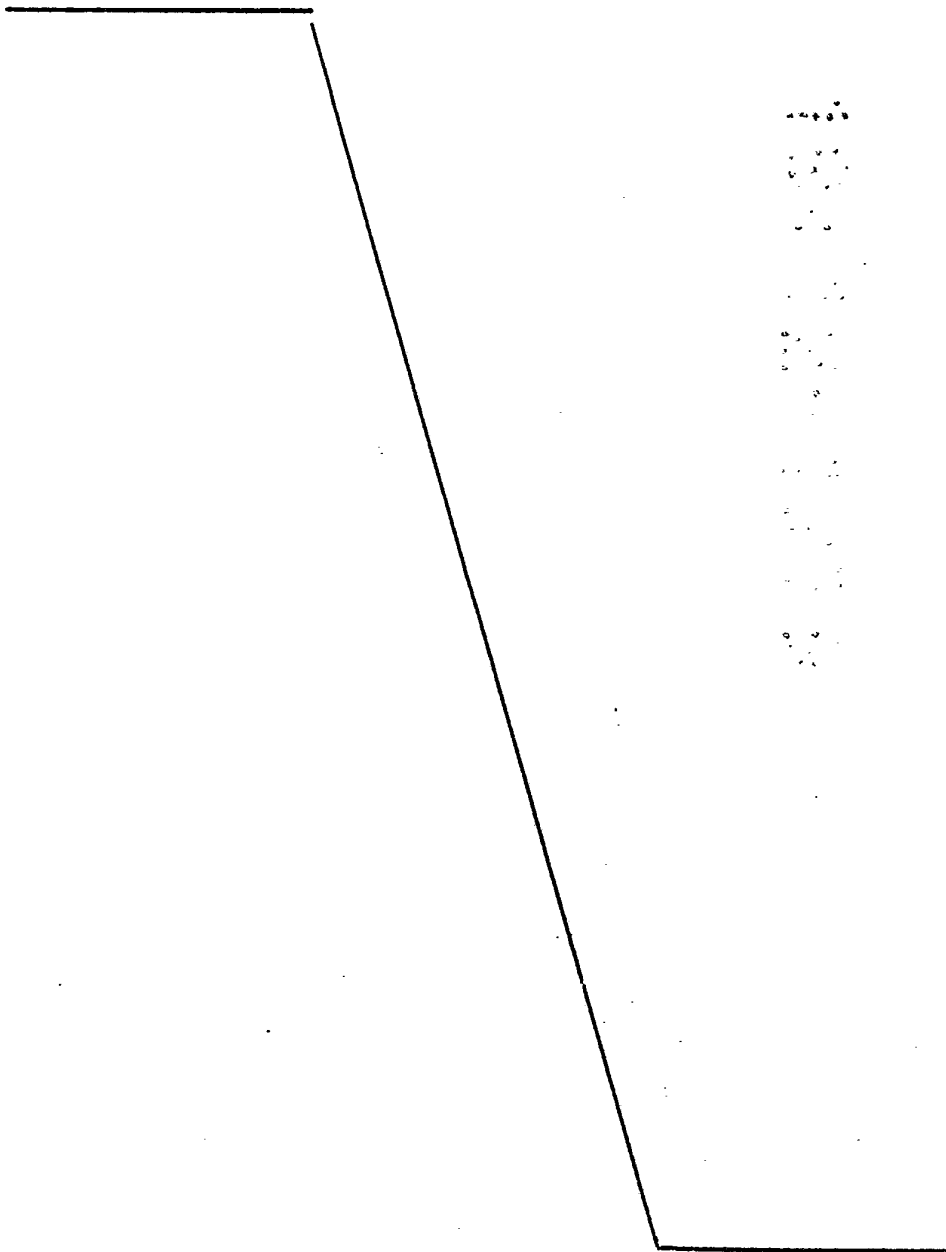
Lote	delta 2C														
	15'	30'	45'	1 h	1h 15'	1h 30'	1h 45'	2 h	2h 30'	3 h	3h 30'	4 h	4h 30'	5 h	5h 30'
GN 153	0,03	0	0	-0,016	-0,05	-0,03	-0,03	-0,03	-0,10	-0,10	0	-0,16	-0,15	-0,16	-0,18
GN 155	+0,06	+0,50	+0,83	+1,05	+1,16	+1,16	+1,11	+1,06	+1,43	+1,66	+1,90	+1,48	+1,1	+0,71	+0,36
GN 156	+0,06	-0,04	-0,06	-0,16	-0,20	-0,26	-0,26	-0,30	-0,40	-0,46	-0,20	-0,50	-0,44	-0,46	-0,46

GN 153 - Vacunas antipiorricas 2a, estando los proteoglicanos preparados por el procedimiento del ejemplo 4,

GN 156 - Las mismas vacunas, pero estando los proteoglicanos preparados por el procedimiento del ejemplo 5,

GN 155 - Las mismas vacunas que anteriormente pero no habiendo sufrido los proteoglicanos más que una deslipi
dación total al cloroformo.

A los efectos consiguientes se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las reivindicaciones que siguen. - - - - -



REIVINDICACIONES

5. 1.- Procedimiento de preparación de proteoglicanos membranarios bacterianos purificados, caracterizado porque comprende por lo menos una etapa de tratamiento de los proteoglicanos brutos en medio acuoso por una base o un hipobromito seguida por la eliminación del exceso de reactivo y del residuo insoluble, hallándose los proteoglicanos purificados en solución acuosa. - - - - -

10. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la base utilizada es un hidróxido alcalino con una molaridad comprendida entre 0,05 y 2 M y porque la duración del tratamiento es de algunas horas a una temperatura próxima a la temperatura ambiente. - - - - -

15. 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el hipobromito utilizado es un hipobromito alcalino y porque la duración del tratamiento es de algunas decenas de minutos a la temperatura ambiente. - - - - -

20. 4.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el exceso de reactivo es eliminado por diálisis y el residuo insoluble es eliminado por centrifugación. - - - - -

5.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el procedimiento de pre

paración comprende por lo menos una etapa de hidrólisis con ácido acético en medio acuoso de los proteoglicanos membrana- rios a una temperatura comprendida entre 70 y 100°C y eli- minación de la fracción insoluble. - - - - -

5. 6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracte- rizado porque la hidrólisis ácida es realizada con la ayu- da de ácido acético glacial al 1% en volumen. - - - - -

7.- Procedimiento según cualquiera de las reivin- dicaciones 1 a 6, caracterizado porque los proteoglicanos se extraen de bacterias gram negativas. - - - - -

8.- Procedimiento según la reivindicación 7, caracte- rizado porque las bacterias gram negativas se eligen de en- tre: - - - - -

- 15. *Klebsiella pneumoniae*
- Serratia marcescens*
- Escherichia coli*

9.- "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE PROTEOGLICA- NOS MEMBRANARIOS BACTERIANOS PURIFICADOS". - - - - -

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

MADRID 19 DIC. 1979

P.A. M. CUREL SUICOR