

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 990**

51 Int. Cl.:

A61K 39/108 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2008 PCT/US2008/055902**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2008 WO08109667**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2008 E 08731429 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2117587**

54 Título: **Extracto bacteriano para trastornos del tracto digestivo o urinario y procedimiento para su preparación**

30 Prioridad:

05.03.2007 US 904787 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.04.2018

73 Titular/es:

**OM PHARMA (100.0%)
RUE DU BOIS-DU-LAN 22
1217 MEYRIN 2, CH**

72 Inventor/es:

**BAUER, JACQUES, ALAIN;
SALVAGNI, MARCO;
VIGROUX, JEAN-PIERRE, LEON;
CHALVET, LAETITIA y
CHIAVAROLI, CARLO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 664 990 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Extracto bacteriano para trastornos del tracto digestivo o urinario y procedimiento para su preparación

Descripción de la invención

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a extractos de cepas bacterianas útiles como tratamiento para indicaciones tales como trastornos del tracto digestivo o urinario, a las composiciones que comprenden los extractos, y a los procedimientos para la preparación de los extractos utilizando medios que no presentan un riesgo de enfermedades por priones.

Antecedentes y compendio de la invención

- 10 La presente invención se refiere a composiciones que comprenden extractos bacterianos útiles para el tratamiento de indicaciones tales como trastornos del tracto urinario o digestivo. Los extractos pueden comprender productos lisados bacterianos de cultivos seleccionados entre las siguientes cepas de *E. coli*: NCTC: 8603, 8621, 8622, 8623, 9026, 9111, 9119, 9707, y 9708 e I: 081, 082, 083, 084, 085, 086, 087, 088 y 089. Esas cepas se depositan conforme al Tratado de Budapest. Las cepas indicadas en la lista con el número I fueron indexadas por la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75724 París, Francia. Todas las demás cepas fueron indexadas por la Colección Nacional de Cultivos Tipo en Londres.

- 15 Los extractos se pueden obtener mediante un procedimiento de lisis alcalina después de que las células crezcan hasta una densidad óptica adecuada en un medio de cultivo. En algunas realizaciones, las bacterias se cultivan cada una en un medio que no presenta un riesgo de enfermedades relacionadas con priones o un riesgo de otras enfermedades que pueden transmitirse a través de la ingestión de productos obtenidos de medios basados en animales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se utiliza un medio a base de vegetales para cultivar las células, tal como un medio a base de soja. Se puede utilizar un medio sintético para el crecimiento celular en algunas realizaciones, o un medio que incluye extractos biológicos tales como extracto de levadura y suero de caballo, que tampoco presentan tales riesgos de enfermedad.

- 20 Los productos lisados también se pueden filtrar para eliminar los ácidos nucleicos y los restos celulares más grandes. Como consecuencia de la filtración, en algunas realizaciones, la cantidad de ácido nucleico presente en los extractos es menor que 100 µg/ml. En algunas realizaciones, los compuestos insolubilizados tales como los restos de la pared celular y los lipopolisacáridos (LPS) insuficientemente degradados también se eliminan mediante la filtración. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el extracto resultante comprende componentes moleculares solubles y no contiene cantidades significativas de material insoluble o particulado.

- 25 Los componentes sacáridos se pueden conservar en los extractos, incluidos los componentes lipopolisacáridos (LPS). Durante el procedimiento de lisis, los sacáridos se pueden modificar químicamente, por ejemplo, escindir a estructuras más pequeñas o se pueden sustituir con otros grupos funcionales.

- 30 La racemización de los aminoácidos durante el procedimiento de lisis también crea D-aminoácidos a partir de los L-aminoácidos naturales que se encuentran en las proteínas naturales. Los D-aminoácidos pueden ser beneficiosos para aumentar el tiempo de efectividad de los extractos, ya que no son digeridos eficazmente en el intestino de los mamíferos. Por lo tanto, las moléculas antigénicas en los extractos que se modifican químicamente durante la lisis para que contengan D-aminoácidos permanecen en el cuerpo del paciente durante más tiempo, lo que permite potencialmente una acción inmunoestimuladora más fuerte.

- 35 Si bien se han utilizado extractos bacterianos en la técnica anterior para estimular el sistema inmunológico contra enfermedades del tracto digestivo y urinario, ha habido una necesidad de normalizar y controlar mejor esos extractos para hacerlos más seguros, más eficaces y de mayor duración. Por ejemplo, antes se pensaba que los componentes sacáridos, incluidos los componentes lipopolisacáridos (LPS) potencialmente tóxicos, deberían eliminarse de los extractos bacterianos por razones de seguridad. (Véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.424.287.

- 40 Sin embargo, la presente invención proporciona un procedimiento que da como resultado modificaciones químicas suficientes de los componentes LPS que los sacáridos conservan de forma segura. La conservación de esos componentes también puede mejorar la eficacia al proporcionar antígenos adicionales.

- 45 Por ejemplo, los autores de la presente invención han descubierto que al controlar el pH y el tiempo de lisis se permite una degradación suficiente de los componentes de la pared celular potencialmente alergénicos o tóxicos. Las condiciones de lisis previas a pH más bajos o tiempos más cortos, por el contrario, produjeron extractos en los que los componentes de la pared celular y los LPS no se modificaron químicamente de manera suficiente. (Véase, p. ej., el documento GB 2 054 374 A). Los extractos resultantes eran demasiado alergénicos para ser administrados de forma segura a los pacientes. En general, los autores de la presente invención han descubierto que los productos lisados a un pH demasiado bajo y/o durante un tiempo demasiado corto tienen mayor toxicidad, menor extracción de proteína y menor filtrabilidad.

Además, la presente invención produce cepas bacterianas en medios de cultivo que no presentan riesgos de enfermedad, tales como las enfermedades por priones.

5 El procedimiento de filtración también puede influir en las propiedades del extracto resultante en algunos casos, ya que el tamaño de poro del filtro y, a veces, las propiedades químicas de la superficie del filtro, alteran el tipo de materiales que se eliminan y retienen. Por ejemplo, la presente invención utiliza un procedimiento de filtración que retiene ciertos sacáridos pero elimina otros componentes moleculares tales como ácidos nucleicos.

Por lo tanto, la presente invención proporciona parámetros que normalizan los extractos bacterianos para ayudar a mantener una seguridad y eficacia constantes.

Breve descripción de los dibujos

10 Figura 1: Un diagrama de un sistema de filtración de flujo tangencial (FFT) para la preparación de extractos bacterianos después de la lisis de bacterias. El diagrama muestra dos configuraciones diferentes para filtros: un modo paralelo donde todos los filtros funcionan simultáneamente y un modo de serpentín donde los filtros están configurados en un modo en serie.

15 Figura 2: Actividad de extractos en un ensayo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a una concentración inicial de biomasa para la lisis de 12,5 g/L (parte A) y 25 g/L (parte B). (Véase el Ejemplo 5A para más detalles).

Figura 3: Actividad de los extractos en un ensayo de PBMC a una concentración inicial de biomasa para la lisis de 25 g/L (parte A) y 100 g/L (parte B).

20 Figura 4: Actividad de extractos en un ensayo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en un tiempo de lisis de 24 horas (parte A) y 72 horas (parte B).

Figura 5: Efecto de la concentración de NaOH durante la lisis sobre la actividad del óxido nítrico (NO) de los macrófagos.

Figura 6: Valores medios totales de unidades formadoras de colonias (UFC) en los tejidos de la vejiga (parte A) y del riñón (parte B) para diferentes grupos experimentales.

25 Figura 7: Registros de muerte en grupos experimentales durante el período de 21 días después de la infección con 10^4 UFC de *Salmonella typhimurium*.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

30 Extracto: Un extracto, según se define en la presente memoria, representa material obtenido después de la lisis de cepas bacterianas. En algunos casos, el extracto se obtiene de una sola cepa, mientras que en otros el extracto es una mezcla de extractos de diferentes cepas.

Lisis alcalina: Este es un método para lisar células bacterianas en condiciones alcalinas, tal como el uso de un álcali orgánico o inorgánico.

Productos lisado: Un extracto de bacteria obtenido de un procedimiento de lisis celular.

35 Filtración: Un procedimiento de filtración, como se describe en la presente memoria, significa un paso de un extracto o una mezcla de extractos, a través de uno o más filtros tales como microfiltros (es decir, microfiltración) o ultrafiltros (es decir, ultrafiltración). Dicha filtración puede no eliminar necesariamente el 100% de los componentes para cuya eliminación está diseñado. En algunos casos, la filtración se repite en varios pasos o ciclos.

40 pH inicial: Ese término representa el pH medido al comienzo de un procedimiento, tal como la lisis bacteriana o la filtración.

Sacáridos: Un sacárido, tal como se define en la presente memoria, incluye monosacáridos, disacáridos, así como sacáridos más grandes tales como polisacáridos lineales y ramificados. Los sacáridos también incluyen sacáridos sustituidos o químicamente modificados, tales como lipopolisacáridos (LPS) y sus variantes químicamente modificadas.

45 D-aminoácidos: este término se refiere a aminoácidos que existen en formas isoméricas dextro-rotatorias, en oposición a los L-aminoácidos producidos de forma biosintética, que existen en formas isoméricas levo-rotatorias.

Racemización: Este término indica al menos una modificación química parcial de L-aminoácidos a D-aminoácidos.

Medio que evita el riesgo de enfermedades basadas en priones significa un medio de cultivo utilizado en cualquier fase de la preparación de los extractos que no comprende materiales tales como suero o extractos de carne

5 tomados de animales tales como vacas u ovejas, o de cualquier otro animal que puede transmitir enfermedades basadas en priones. Los ejemplos de tales medios incluyen medios químicamente definidos basados en vegetales o sintéticos y también medios que utilizan suero de caballo o medios que comprenden materiales tomados de especies animales que no transmiten enfermedades priónicas. Los ejemplos de enfermedades basadas en priones incluyen, por ejemplo, la enfermedad de las vacas locas, la tembladera y la enfermedad de Creutzfeld-Jacob.

Un medio no animal es un medio que no incluye componentes derivados de animales. Los ejemplos incluyen un medio a base de vegetales (es decir, vegetal), tal como un medio de soja y un medio sintético.

10 Tratamiento según se utiliza en la presente memoria significa tanto el tratamiento de las infecciones actuales como de otras afecciones, por ejemplo, así como la prevención o protección frente al desarrollo de nuevas infecciones, por ejemplo.

Sujeto, según se utiliza en la presente memoria, significa cualquier sujeto animal, incluidos sujetos mamíferos, tales como seres humanos y mamíferos domésticos.

15 Se entiende que las cepas bacterianas específicas identificadas en la presente memoria y utilizadas en la invención pueden incluir la cepa obtenida del depósito original mencionado en este documento o un clon genético del mismo, incluyendo una cepa que se ha vuelto a depositar en un momento posterior con un nombre de código de depósito diferente, pero que se considera que es genéticamente la misma cepa que la versión originalmente depositada.

Todos los números utilizados en la presente memoria son aproximados, teniendo en cuenta los errores inherentes a su medición, redondeo y cifras significativas.

Preparación de extractos

20 Los extractos bacterianos de la presente invención se pueden preparar por fermentación seguida de inactivación por calor, concentración y recolección de biomasa, lisis alcalina de biomasa bacteriana individual o lisis alcalina de mezclas de biomasa bacteriana bajo condiciones definidas. Los productos lisados alcalinos en diferentes condiciones se pueden mezclar antes de la purificación por filtración. El producto filtrado obtenido se puede purificar adicionalmente, por ejemplo para eliminar materia particulada, y también puede ser liofilizado y/o formulado.

25 Para cada cepa, para obtener una cantidad suficiente de material, los cultivos de fermentación se pueden iniciar a partir de un lote de siembra en funcionamiento seguido de la inoculación en recipientes de fermentación más grandes.

30 Los medios utilizados pueden ser los mismos para cada especie. Sin embargo, se pueden introducir factores de crecimiento suplementarios para mejorar el crecimiento de algunas especies. En algunas realizaciones, se utiliza un medio que evita el riesgo de enfermedades basadas en priones para cultivar al menos algunas, o todas las cepas. Los ejemplos incluyen medios no animales tales como un medio basado en vegetales y medios sintéticos. Otros ejemplos incluyen un medio que incluye suero de caballo u otro extracto animal, que se toma de una especie de animal que no representa una amenaza de enfermedades por priones, en contraste con cepas cultivadas en presencia de suero bovino o extractos de carne que pueden presentar tales riesgos

35 En algunas realizaciones, la fermentación puede comenzar con un cultivo pequeño tal como 0,1 a 1,0 litros, incubado durante aproximadamente 3 a 6 horas a 30 a 40°C, tal como 37°C, para obtener una densidad óptica (DO) a 700 nm de 3,0 a 5,0. Después de una etapa de cultivo a pequeña escala, se pueden realizar cultivos adicionales en uno o en una serie de fermentadores más grandes de 30° C a 40°C durante un período de 3 horas a 20 horas, por ejemplo, de 3 a 10 horas u 8 horas.

40 Después de la fermentación, la biomasa de cada cepa o de un conjunto de cepas se puede inactivar mediante un tratamiento térmico, concentrar y congelar. Después de descongelar las biomasas congeladas, la suspensión bacteriana se puede diluir y alcalinizar a continuación para lisar las células bacterianas con una solución concentrada de iones hidróxido, por ejemplo de NaOH. En algunas realizaciones, se lisan de aproximadamente 10 a aproximadamente 120 g/L de peso seco bacteriano de una o una mezcla de cepas, tal como de aproximadamente 15 a aproximadamente 80 g/L, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 g/L, tal como 15, 20, 25, 30 o 35 g/L. En algunas realizaciones, se lisan de aproximadamente 40 a aproximadamente 80 g/L, tal como 40, 50, 60, 70 u 80 g/L. (La concentración de peso seco bacteriano se define por la cantidad de biomasa seca por litro de lisis. La concentración de peso seco se mide secando 5 mL de material en un plato pequeño de porcelana a 105°C hasta que alcanza una masa constante y luego se registra la masa en gramos por litro). En algunas realizaciones, se utiliza una concentración de álcali fuerte de 0,01 N a 1,2 N, tal como, de 0,10 N a 1,1 N, o de 0,10 N a 0,65 N, o de 0,10 N a 0,4 N, o un intervalo que comienza o termina en 0,1, 0,2, 0,3, o 0,4 N, o de 0,6 N a 1,1 N, o un intervalo que comienza o termina en 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, o 1,1 N, o se utiliza una concentración de álcali para alcanzar un pH inicial de 12 o más, o un pH de más de 12, un pH mayor que 12 y menor que 13,5, tal como mayor de 12,5, mayor de 12,6, mayor de 12,8, o de un pH de 12,6 a un pH de 13,4. El pH durante la lisis puede disminuir con la extracción de compuestos solubilizados. Por lo tanto, el pH se puede ajustar durante el procedimiento. La temperatura de lisis puede ser de 30 a 60°C, tal como de 35 a 40°C, tal como 37°C. El tiempo de lisis puede variar de 20 horas a varios días, tal como 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días, o de 30 a 120 horas, o de 30 a 50 horas, tal como 30, 35, 40, 45 o 50 horas, o

de 60 a 120 horas, tal como 60, 72, 84, 96, 108 o 120 horas. Los extractos se pueden hacer volver después a un pH más bajo, mezclarse entre sí según se desee y filtrarse.

Después de la lisis, el peso seco solubilizado puede ser de 20 a 180 mg/mL. (El peso seco solubilizado se determina por el mismo método que el peso seco bacteriano descrito anteriormente y, alternativamente, se puede referir en unidades de mg/g, suponiendo que la densidad del producto lisado soluble es de 1 g/mL). La concentración de proteína restante medida por el método de Lowry puede ser de 8 a 75 mg/mL, tal como de 10 a 70 mg/mL, de 20 a 60 mg/mL, o un intervalo que comienza o termina en 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o 70 mg/mL. La concentración de sacáridos medida por el método de la antrona para determinar el azúcar reductor total, después de la lisis de una mezcla de cepas puede ser de 0,8 a 4 mg/mL, tal como de 1 a 3,5 mg/mL, de 1,2 a 3 mg/mL o un intervalo que comienza o termina en 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 o 4 mg/mL.

La lisis se puede realizar en una sola cepa a la vez, o en una mezcla de todas las cepas deseadas. Por ejemplo, se puede obtener un extracto mixto mezclando, por ejemplo, dos o más productos lisados bacterianos. Cada producto lisado puede contener de 10 g/L de peso seco de biomasa a 90 g/L, tal como 15-85 g/L, o 20-80 g/L, o 25-75 g/L, o 30-70 g/L, o 35-65 g/L o 40-60 g/L, o 15-35 g/L, o 40-80 g/L. Cada producto lisado de este tipo puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente 20% a 80% del extracto total en volumen. Las proporciones en volumen de mezcla de los dos productos lisados pueden ser, por ejemplo, 25%-75%, o 75%-25%, 70%-30%, o 30%-70%, o 60%-40%, o 40%-60%, o 50-50%.

Los productos lisados se pueden purificar por centrifugación y/o filtración. Por ejemplo, los productos lisados se pueden centrifugar a 9000 x gravedad, seguido de una o más rondas de filtración en un filtro de 0,2 micras que se puede utilizar para purificar el extracto. En algunos casos, se pueden utilizar rondas sucesivas de filtración en filtros de poro más grandes seguido de filtración en un filtro de 0,2 micras. Los métodos de ultrafiltración también se pueden emplear para ayudar a extraer materiales solubles del extracto, por ejemplo, recirculando el permeato de ultrafiltración para una microfiltración adicional.

En algunas realizaciones, se puede utilizar un método de filtración de flujo tangencial (FFT) para filtrar los extractos y para extraer moléculas solubilizadas de desechos celulares más grandes. (Véase la Figura 1). (Véanse, por ejemplo, Separations Technology, Pharmaceutical and Biotechnology Applications, Wayne P. Olson, Editor. Interpharm Press, Inc., Buffalo Grove, IL, USA, pág. 126 a 135 - ISBN: 0-935184-72-4). Al comienzo de semejante procedimiento de FFT, se puede almacenar en un primer tanque un producto lisado bacteriano diluido. Se inicia un ciclo de microfiltración (MF), y el producto se bombea y el retentado de MF resultante se recicla, mientras que el permeato de MF se transfiere a un segundo tanque.

Después de alcanzar un grado adecuado de concentración, se inicia un ciclo de ultrafiltración (UF). El permeato de UF se puede hacer recircular al primer tanque para la extracción continua de compuestos solubilizados del producto lisado, mientras que el retentado de UF se puede almacenar en el segundo tanque. Durante la extracción continua, los volúmenes en los tanques 1 y 2 se pueden ajustar mediante la regulación de las velocidades de flujo de los permeatos de microfiltración y ultrafiltración.

Varios de tales ciclos de extracción se pueden realizar, ya sea con FFT u otro método de filtración. En realizaciones que utilizan FFT, al final del último ciclo, el circuito de ultrafiltración se puede cerrar y el circuito de microfiltración puede funcionar solo y el permeato de la MF se puede transferir al tanque 2.

El circuito de microfiltración puede estar equipado con filtros de 1,2 micras a 0,1 micras, tales como filtros de 0,65 a 0,2 micras, o 0,45 micras. El flujo cruzado puede estar entre 1.000 Litros/hora m² (LHM) y 3.000 LHM, tal como entre 1.500 y 2.500 LHM, o 2.000 LHM con una presión transmembrana (PTM) de 0,6 a 2 bares, tal como entre 0,8 y 1,5 bares o 1,0 bares. El circuito de ultrafiltración puede estar equipado con filtros de 10 KDa a 1.000 KDa, tal como de 10 KDa a 100 KDa, o de 10 KDa a 30 KDa, o de 30 KDa a 100 KDa. El flujo cruzado puede estar entre 30 LHM y 1.000 LHM, tal como entre 20 y 500 LHM con una PTM de 0,2 a 1,5 bares, tal como entre 0,4 y 1,2 bares, o 0,5 bares.

Se pueden utilizar entre 5 y 20 volúmenes de diafiltración para extraer compuestos solubilizados de las paredes celulares bacterianas. En algunas realizaciones, se utilizan entre 8 y 15 volúmenes. Por lo tanto, por ejemplo, en algunas realizaciones, se pueden utilizar entre 5 y 15 ciclos de filtración, en algunos casos entre 8 y 15 ciclos, tal como 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 ciclos.

Después de la filtración, el extracto se puede concentrar o centrifugar más, si se desea. Por ejemplo, se puede realizar una microfiltración adicional utilizando un filtro de poro más pequeño, tal como un filtro de 0,2 micras. Después de la filtración, el rendimiento de proteínas solubilizadas medido por Lowry puede ser de 50 a 90% o más de 60%. Después de la filtración, el extracto se puede liofilizar antes de formularlo para su uso.

En algunas realizaciones de la invención, se puede elegir una selección de condiciones de lisis con el fin de obtener una lisis "fuerte" o "moderada". Por ejemplo, en algunas realizaciones, se puede lograr una lisis fuerte lisando de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 g/L de peso seco bacteriano, tal como 15, 20, 25, 30 y 35 g/L o intervalos más pequeños limitados por esas concentraciones (p. ej., 15-20, 20-25, 20-30, etc.), con ion hidróxido de 0,6 a 1,1 N, tal como 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, o 1,1 N o intervalos más pequeños delimitados por esas concentraciones,

durante 60 a 120 horas, tal como 60, 70, 80, 90, 100, 110 y 120 horas o intervalos más pequeños delimitados por esos tiempos, a 30-40°C, tal como 35-40°C, 30-35°C, o 37°C. Por lo tanto, según se utiliza en la presente memoria, una lisis "fuerte" implica el uso de la concentración bacteriana en peso seco, la concentración de ion hidróxido, el tiempo y la temperatura que caen dentro de cada uno de los intervalos más amplios anteriores. En otras realizaciones, se puede lograr una lisis moderada por lisis de aproximadamente 40 a aproximadamente 80 g/L de peso seco bacteriano (p. ej., 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80) con ión hidróxido 0,1 a 0,4 N (es decir, 0,1, 0,2, 0,3 o 0,4) durante 30 a 50 horas (p. ej., 30, 35, 40, 45 o 50 horas) a 30-40°C, tal como 35-40°C, 30-35°C, o 37°C. Por lo tanto, según se utiliza en la presente memoria, una lisis "moderada" implica el uso de la concentración de peso seco bacteriano, la concentración de ion hidróxido, el tiempo y la temperatura que caen dentro de cada uno de los intervalos más amplios anteriores. En algunas realizaciones, se puede preparar una mezcla de dos productos lisados bacterianos tales como un producto lisado fuerte y uno moderado como se describió anteriormente, tal como una mezcla de 10% a 90%, una mezcla en volumen de 20/80, 25/75, 35/65, 50/50. (Véanse, por ejemplo, los ejemplos 8 y 9 a continuación). En algunas realizaciones, todas las cepas que se van a utilizar en el extracto se pueden someter tanto a una lisis fuerte como a una lisis moderada, mezclando a continuación los productos lisados resultantes entre sí. O alternativamente, algunas cepas se pueden someter a una lisis fuerte, mientras que otras se someten a una lisis moderada. La filtración de esos productos lisados puede ocurrir antes o después de la mezcla, por ejemplo, mediante el método FFT a través de un circuito de MF con un filtro de 0,65 a 0,2 micrómetros, tal como un filtro de 0,6, 0,55, 0,5, 0,45, 0,4, 0,35, 0,3 o 0,25 micras y un circuito de UF con un filtro de 10 o 30 KDa, para un total de 8 a 15 ciclos, tal como 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 ciclos. Una vez preparados, los extractos de la presente invención se pueden purificar para eliminar la materia particulada.

Propiedades químicas de los extractos bacterianos

Algunas realizaciones de acuerdo con la presente invención pueden contener, por ejemplo, 5-75 mg/mL de proteínas, o 10-65 mg/mL, o 20-45 mg/mL, o 5-40 mg/mL, o 5-20 mg/mL, de proteínas o un intervalo que comienza o termina en 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 o 75 mg/mL; de 1,5 a 2,5 mg/mL de aminoácidos libres (A.A.), o de 1,5 a 2 mg/mL, o de 2 a 2,5 mg/mL de A.A. libres, o un intervalo que comienza o termina en 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4 o 2,5 mg/mL de A.A. libres, calculado a partir del ácido glutámico (147,1 g/mol); y de 0,3 a 4,5 mg/mL de polisacáridos y monosacáridos, o de 0,3 a 4 mg/mL, o de 0,4 a 4 mg/mL, o de 0,5 a 3,5 mg/mL, o de 0,6 a 3 mg/mL o de 0,3 a 1 mg/mL o un intervalo que comienza o termina en 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, o 4,5 mg/mL de polisacáridos y monosacáridos. Por ejemplo, algunas realizaciones contienen aproximadamente 5 a 9 mg/mL de proteínas, 2 mg/mL de aminoácidos libres (A.A.), calculados a partir de ácido glutámico (147,1 g/mol) y/o aproximadamente de 0,3 a 0,6 mg/mL de polisacáridos y monosacáridos.

En algunas realizaciones, la concentración de equivalentes de LPS basada en un ensayo cromogénico de lisado de amebocitos de limulus (LAL) es menor de 5.000 ng/ml, o menor de 2.000 ng/ml, o menor de 1.000 ng/ml, o menor de 750 ng/mL, o menor de 500 ng/mL, o menor de 200 ng/mL, o menor de 100 ng/mL.

La lisis de bacterias de acuerdo con la presente invención puede dar como resultado la hidrólisis parcial de compuestos anfífilos tales como lipopolisacáridos y lipopéptidos. La lisis de bacterias de acuerdo con la presente invención también puede dar como resultado la hidrólisis parcial de proteínas así como la desaminación, desamidación y racemización parcial de aminoácidos de L a D. En un estudio analítico de un extracto de acuerdo con la invención, después de la hidrólisis total con HCl del extracto y la derivatización de los aminoácidos, se observaron picos de cromatografía de gases que representaban ácido D-aspartico y D-asparagina, ácido D-glutámico y D-glutamina, D-serina, D-metionina, D-histidina, D-alanina, D-arginina, D-fenilalanina, D-tirosina, D-leucina, D-lisina, D-valina, D-treonina. El porcentaje de D-aminoácidos de esas especies en ese estudio varió de 3% a 80%. Por lo tanto, algunas realizaciones de la invención permiten la racemización de uno o más de serina, metionina, ácido aspártico y asparagina, treonina, histidina, alanina, arginina, tirosina, fenilalanina, leucina y lisina, tales como todos los aminoácidos anteriores, o cualquier selección de más de uno pero menos de todos los aminoácidos anteriores, tal como, por ejemplo, serina, ácido aspártico, asparagina, alanina, fenilalanina, tirosina y lisina, o una selección de esos aminoácidos. En algunas realizaciones, al menos 10% de uno o más de los aminoácidos anteriores puede experimentar racemización de L a D. En otras realizaciones, al menos 30% de uno o más de los aminoácidos anteriores puede experimentar racemización.

Actividades biológicas de extractos bacterianos

Los extractos de acuerdo con la invención pueden ser eficaces para el tratamiento de pacientes que padecen o están en riesgo de desarrollar trastornos del tracto urinario o digestivo, tales como infecciones del tracto digestivo y urinario. Los extractos de acuerdo con la invención pueden ser eficaces en la prevención de infecciones recurrentes del tracto urinario. Los ejemplos de trastornos que se pueden tratar por medio de extractos de la invención incluyen infecciones por *E. coli* y otras infecciones bacterianas, uretritis, nefritis tubulo-intersticial, pielonefritis obstructiva, infecciones del tracto urinario debidas a uropatía obstructiva y de reflujo, cistitis que incluye cistitis crónica, prostatitis incluyendo prostatitis crónica, prostatocistitis, enfermedades inflamatorias pélvicas femeninas, enfermedad de Crohn y síndrome del intestino irritable.

La actividad biológica de los extractos se puede determinar mediante varios análisis. Por ejemplo, un análisis de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) somete a ensayo la producción de la citoquina IL-6 a partir de

PBMC y puede escrutar la capacidad de un extracto para estimular el sistema inmunológico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la concentración de IL-6 *in vitro* medida en sobrenadantes de PBMC estimuladas con los extractos de la invención varió de 2.000 pg/ml a 70.000 pg/ml, de 2.000 pg/ml a 50.000 pg/ml, de 2.000 pg/ml a 30.000 pg/ml, de 2.000 pg/ml a 20.000 pg/ml, de 2.000 pg/ml a 10.000 pg/ml, o de 5.000 pg/ml a 70.000 pg/ml, de 5.000 pg/ml a 50.000 pg/ml, de 5.000 pg/ml a 30.000 pg/ml, de 5.000 pg/ml a 25.000 pg/ml, o de 5.000 pg/ml a 10.000 pg/ml, o de 15.000 pg/ml a 25.000 pg/ml. Cuando se utilizó LPS como control agonista (a 0,01 µg/ml), los valores obtenidos variaron, dependiendo de los donantes, de 5.000 pg/ml a 70.000 pg/ml.

Un ensayo de óxido nítrico (NO) murino mide la producción de NO por macrófagos murinos, lo que también indica una estimulación inmunológica. Por ejemplo, los macrófagos producen NO para destruir las bacterias invasoras. En algunas realizaciones, la actividad de óxido nítrico (NO) *in vitro* para las realizaciones de la presente invención sometidas a ensayo a concentraciones que varían de 0,001 mg/mL a 10 mg/mL de peso seco soluble proporcionó respuestas máximas que variaban de óxido nítrico 3 µM a 100 µM, o de 3 µM a 90 µM, de 3 µM a 80 µM, de 3 µM a 70 µM, de 3 µM a 60 µM, de 3 µM a 50 µM, de 3 µM a 40 µM, de 3 µM a 30 µM, de 3 µM a 20 µM, de 3 µM a 10 µM o de 5 µM a 80 µM, de 5 µM a 60 µM, de 5 µM a 40 µM, de 5 µM a 20 µM, o de 10 µM a 80 µM, de 10 µM a 70 µM, de 10 µM a 50 µM, de 10 a 30 µM o de 10 µM a 15 µM, o intervalos que comienzan o terminan en 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 µM.

Las actividades observadas en células mononucleares de sangre periférica humana y macrófagos murinos *in vitro* pueden depender de variables tales como la cantidad de peso seco bacteriano que se vaya a lisar, es decir, el "material de partida" para la lisis, la duración de la lisis alcalina, y el porcentaje inicial de NaOH o el pH inicial utilizado en la lisis.

La combinación de ensayos de actividad *in vitro* tales como PBMC y NO con la determinación de la concentración de LPS por ejemplo por medio de LAL también puede proporcionar información sobre el balance de actividad frente al riesgo de toxicidad para un extracto bacteriano dado.

Las actividades observadas *in vivo* en animales en modelos de infección muestran que algunas realizaciones de la presente invención tienen un efecto protector. Véase, por ejemplo, el ejemplo 9, que muestra el tratamiento repetido de animales con extractos ilustrativos de acuerdo con la invención. En un modelo *in vivo* de infección del tracto urinario por *E. coli* (ejemplo 8), los animales que reciben administraciones orales preventivamente repetidas de extractos ilustrativos de acuerdo con la invención muestran una cantidad menor de bacterias en el tracto urinario (vejiga y riñones).

Por ejemplo, la tasa de supervivencia 13 días después de la exposición de al menos 8 ratones insensibles a LPS con una cepa de *E. coli* 1677 uropatógena, es al menos 60% cuando esos ratones se tratan primero durante 10 días con cantidades eficaces de algunas realizaciones de la presente invención. La dosis de *E. coli* uropatógena para la exposición se puede elegir de manera que los ratones no tratados o los ratones tratados con agua o control de formulación blanco que contiene excipientes pero que no tiene extracto, tienen una tasa de supervivencia de 60% o menos, tal como 50% o menos. En algunos casos, la tasa de supervivencia de ratones tratados con las realizaciones de la presente invención en semejante modelo es al menos 70%, al menos 80%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95%.

Como otro ejemplo, la tasa de supervivencia 13 días después de la exposición de al menos 8 ratones con sensibilidad de LPS de tipo salvaje a *Salmonella thyphimurium*, es al menos 60% cuando esos ratones se tratan primero durante 10 días con cantidades eficaces de algunas realizaciones de la presente invención. La dosis de *Salmonella thyphimurium* para la exposición se puede elegir de manera que los ratones no tratados o los ratones tratados con agua o un control de formulación blanco que contiene excipientes pero que no tiene extracto, tienen una tasa de supervivencia de 60% o menos, tal como 50% o menos. En algunos casos, la tasa de supervivencia para los ratones tratados con extracto es de al menos 70%, al menos 80%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95%.

Composiciones que comprenden los extractos bacterianos

Un extracto de acuerdo con la invención se puede formular de varias maneras diferentes para su administración eventual. Por ejemplo, se pueden preparar comprimidos, cápsulas y píldoras orales, así como formulaciones líquidas o aerosoles. También se pueden preparar formulaciones para infusión o inyección.

Las realizaciones de esta invención se pueden formular, por ejemplo, como formas de dosificación sólidas o formas de dosificación líquidas. Las formas de dosificación sólidas ilustrativas pueden incluir, por ejemplo, un comprimido, p. ej. comprimido recubierto, comprimido masticable, comprimido efervescente, comprimido sublingual, productos granulados, polvo o cápsula) que contiene el extracto y, opcionalmente, uno o más suplementos nutricionales y/o dietéticos. Las formas de dosificación sólidas también pueden contener diluyentes, cargas y/u otros excipientes. Se pueden agregar otros componentes excipientes tales como conservantes, colorantes, aromatizantes y edulcorantes. También es posible preparar formulaciones en polvo o granuladas. Las formas de dosificación líquidas como soluciones, jarabes, suspensiones o gotas también se pueden utilizar para la vía oral.

Ejemplos de trabajo

Ejemplo 1. Preparación de un cultivo de cepas de *E. coli*

El medio para *E. coli* I-081 (E81), *E. coli* I-082 (E82), *E. coli* I-083 (E83), *E. coli* I-084 (E84), *E. coli* I-085 (E85), *E. coli* I-086 (E86), *E. coli* I-087 (E87), *E. coli* I-088 (E88), *E. coli* I-089 (E89), *E. coli* NCTC 8603 (E8603), *E. coli* NCTC 8621 (E8621), *E. coli* NCTC 8622 (E8622), *E. coli* NCTC 8623 (E8623), *E. coli* NCTC 9026 (E9026), *E. coli* NCTC 9111 (E9111), *E. coli* NCTC 9119 (E9119), *E. coli* NCTC 9707 (E9707), y *E. coli* NCTC 9708 (E9708) se preparó disolviendo los siguientes componentes en agua purificada: cloruro de sodio 3,75 g/L; monohidrogenofosfato de sodio 2,5 g/L; acetato de sodio: 0,625 g/L; peptona vegetal (producto de soja digerido con papaína) 50 g/L; inosina 0,125 g/L; cloruro de calcio 0,025 g/L; cloruro de potasio 0,125 g/L; hidrogenocarbonato de sodio 0,75 g/L; arginina 1 g/L; piruvato de sodio 0,35 g/L; glucosa 3 g/L; y una "solución de elementos concentrados" 0,625 mL/L (que contiene sulfato de cobre 3 mg/L; cloruro de hierro 830 mg/L; sulfato de zinc 860 mg/L y ácido sulfúrico 1,1 mL/L).

Se inocularon 0,1 L de medio con 1,5 mL de bacterias congeladas y se incubaron en un matraz Erlenmeyer de 300 mL a 37°C durante 4 horas con agitación. A continuación, se inocularon 1,0 L de medio en un matraz Erlenmeyer de 3.000 mL con 30 mL del cultivo de 300 mL anterior y se incubaron de nuevo a 37°C durante 4 horas con agitación.

Tabla 1.1: Densidad óptica para etapas de cultivo sucesivas

		DO ERLLEN a 700 nm			
	Etapas	100 mL 1	100 mL 2	1.000 mL	1.000 mL
E8603	Duración [horas]	4	4	4	4
	Cultivo 1	2,84	2,67	2,41	2,29
E89	Duración [horas]	4	4	4	4
	Cultivo 2	2,46	2,45	2,39	2,42
E9111	Duración [horas]	5	5	4,25	4,25
	Cultivo 3	3,13	2,92	2,45	2,50

Se preparó el mismo medio anterior para los prefermentadores, pero con la adición de 0,08 mL/L de polipropilenglicol. Un litro del cultivo de la etapa de incubación anterior se transfirió al prefermentador. La temperatura de incubación se reguló a 30°C, y el prefermentador se agitó. El pH no estaba regulado. La velocidad de flujo de aire estéril se ajustó a 3,3 L/min. Después de 6 horas, dos fermentadores de 25 litros se transfirieron a un fermentador más grande.

Tabla 1.2: Densidad óptica para cultivos de prefermentador:

Número de Ejemplo	Cepa	Duración del cultivo	DO al final del cultivo Pref 1	DO al final del cultivo Pref 2
		[H]	[-]	[-]
Cultivo 1	E8603	6	2,43	2,41
Cultivo 2	E89	6,75	1,95	2,05
Cultivo 3	E9111	12,25	2,00	2,45

Se preparó el mismo medio descrito anteriormente para la siguiente incubación en fermentadores a mayor escala, pero con la adición de 0,05 mL/L de polipropilenglicol y 6 g/L de glucosa antes de la esterilización. La temperatura de incubación se reguló a 37°C, con agitación y aireación durante la incubación. El pH se reguló a 6.8. Se añadieron doce kg de glucosa durante el cultivo. Después de aproximadamente 10,5 horas, los cultivos se inactivaron por calentamiento a entre 90 y 100°C y se transfirieron a un tanque de recolección. La biomasa se separó a continuación para los medios de cultivo y se concentró por centrifugación.

De acuerdo con los medios descritos y las condiciones de cultivo, se prepararon cultivos, como se muestra en las tablas y descripciones a continuación.

ES 2 664 990 T3

Tabla 1.3

Número de Ejemplo	Cepa	Duración del cultivo [h]	DO al final del crecimiento a 700 nm	Volumen total [L]	Volumen de biomasa recogido [mL]	Volumen de 1 alicuota [mL]	Peso seco de biomasa [mg/m L]	Cantidad de peso seco para 1 alicuota [g]
1.2	E81	5	18,72	498	61758	1196	168,4	201
		5	17,84	498				
		5	18,28	497				
1.3	E82	8,5	23,52	491	69584	1062	176,6	188
		8,00	22,52	491				
		7,75	17,08	489				
1.4	E83	7	18,4	489	49275	1481	170,6	253
		7	19,48	490				
		7	18,92	489				
1.5	E84	5,45	23,8	492	66647	928	182,9	170
		5,45	21,08	466				
		5,45	23,2	492				
1.6	E85	7,5	21,28	493	73275	1262	183,4	224
		7,5	20,4	494				
		8,5	20,52	494				
1.7	E86	4,75	19,96 0	491	66898	1116	168,9	188
		4,75	20,84 0	491				
		4,75	19,20 0	491				
1.8	E87	5,25	21,24	490,5	73043	978	172,4	169
		6,5	23,76	492,5				
		6,5	23,36	490,5				
1.9	E88	5,25	16,04	496	47478	906	151,6	137
		5,25	15,2	494				
		5,25	15,4	492				
1.10	E89	5,5	12,00	489	46801	939	179,2	168
		6,5	17,72	492				
		6,75	17,48	492				
1.11	E 8621	5	23,3	493	64830	539	143,6	77,4
		5	21	491,5				
		5	21,6	494				
1.12	E 8622	4,75	19,36	492	67671	343	187	64
		4,75	18,80	493				
		4,75	18,80	493				
1,13	E 8623	4,75	24,36	498	75748	347	178	62
		4,75	24,72	498				
		4,75	24,8	496				

ES 2 664 990 T3

Número de Ejemplo	Cepa	Duración del cultivo [h]	DO al final del crecimiento a 700 nm	Volumen total [L]	Volumen de biomasa recogido [mL]	Volumen de 1 alícuota [mL]	Peso seco de biomasa [mg/m L]	Cantidad de peso seco para 1 alícuota [g]
1.14	E 9026	4,75	28,32	492	63091	346	180,2	62
		4,75	28,08	492				
		4,75	28,40	492				
1.15	E 9111	4,75	14,36	489	41990	621	133,6	83
		4,75	12,92	489				
		4,75	13,6	488				
1.16	E 9119	4,5	28	493	58396	313	190,5	60
		4,5	26,08	493				
		4,5	26,64	492				
1.17	E 9707	4,5	20	492	83381	564	133,8	75
		5,5	21,48	492,5				
		5,25	22,16	493				
1.18	E 9708	4,75	20,24	492	71942	387	167,1	65
		4,75	19,52	491,5				
		4,75	19,6	492				
1.19	E 8603	5,75	23,2	491	76115	336	179,2	60
		4,75	23,48	491				
		5	25,4	493				

Ejemplo 1.20

Se cultivó NCTC9111 con un medio sintético en las mismas condiciones que se describen en el ejemplo 1.2. El medio se preparó disolviendo en 540 L de agua purificada: 0,2220 kg de inosina, 0,3330 kg de ácido cítrico monohidratado, 1,4430 kg de ácido glutámico, 1,1655 kg de cloruro de amonio, 0,7825 kg de sulfato de magnesio · 2 H₂O, 1,5096 kg de fosfato de potasio (KH₂PO₄), 0,3330 kg de arginina, 0,1110 kg de uracilo, 0,0189 kg de cloruro de calcio, 11,8200 kg de cloruro de sodio, 0,5435 kg de L-leucina, 0,5435 kg de L-lisina HCL, 0,5435 kg de L-serina, 0,5435 kg de L-metionina, 0,5435 kg de L-valina, 0,5435 kg de L-alanina, 0,5435 kg de L-asparragina, 14.0000 L de hidróxido de amonio, 0,3420 L de hidróxido de potasio, 40.5000 kg de glucosa, 4,1667 g de cloruro de hierro, 4,1667 g de cobalto cloruro, 4,1667 g de molibdato de sodio, 4,1667 g de sulfato de manganeso, 4,1667 g de sulfato de cinc, 4,1667 g de sulfato de níquel, 0,0833 g de ácido bórico, 0,1667 g de sulfato de cobre, 1,8333 mL de ácido sulfúrico (95-97%).

Ejemplo 2: Lisis alcalina de células

Ejemplo 2.1

Una alícuota de cada una de las siguientes cepas E81, E82, E83, E084, E085, E086, E087, E088, E89, E9111, E 8603, E 8621, E 8622, E8623, E 026, E9119, E9707 y E9708 que contienen 1810 g de peso seco bacteriano se descongeló a temperatura ambiente, a continuación se diluyó con agua purificada para alcanzar 26 g/L de biomasa bacteriana (peso seco). Se realizó la alcalinización con hidróxido de sodio 0,8 M. El pH se midió después de 2 horas de lisis y fue 13,1. Después, la lisis se incubó durante 120 horas a 35-40°C bajo agitación continua. Después de la incubación, el pH se ajustó a 11,3 con HCl concentrado. (Peso seco soluble); PSS: 59,4 mg/mL; Prot: 17,4 mg/mL. El peso seco soluble se determinó obteniendo 5 mL de la fracción soluble resultante de la lisis y secándola a una masa constante en un plato de porcelana a 105°C.

Ejemplo 2.2

De acuerdo con los ejemplos 1.1 a 1.19, se descongelaron a temperatura ambiente 3 alícuotas de E81, E82, E084, E086, E087, E89, 2 alícuotas de E83 y E085, 4 alícuotas de E088, 6 alícuotas de E9111, 9 alícuotas de E 8603, E9119, 7 alícuotas de E8621, E9707 y 8 alícuotas de E 8622, E8623, E9026 y E9708 que contenían un total de

- 5 9.264 g de peso seco bacteriano, a continuación se diluyeron con agua purificada, para alcanzar 50,1 g/L de concentración de biomasa bacteriana (peso seco). La alcalinización con ion hidróxido 0,2 N fue 12,3. La lisis se incubó durante 32 horas a 35-40°C bajo agitación continua. Durante la lisis, se controló el pH para que no disminuyera más de 1,3 unidades de pH. El pH se ajustó a 11,3 con una combinación de HCl concentrado. (Peso seco soluble); PSS: 60,7 mg/mL; Prot: 32,0 mg/mL.
- Ejemplo 2.3
- De acuerdo con la Tabla 2, las biomasas se diluyeron a 58 g/L de concentración de biomasa bacteriana. Se realizó la alcalinización con NaOH 0,4 M. La lisis se incubó durante 1 día a 35-40°C bajo agitación continua. (Peso seco soluble); PSS: 96,8 mg/mL; Prot: 35,3 mg/mL.
- 10 Ejemplo 2.4
- De acuerdo con la Tabla 2, las biomasas se diluyeron a 92 g/L de concentración de biomasa bacteriana. La alcalinización a 0,4 M se realizó con NaOH 10N. La lisis se incubó durante 1 día a 35-40°C bajo agitación continua. PSS: 146,6 mg/mL; Prot: 62,9 mg/mL.
- Ejemplo 2.5
- 15 De acuerdo con la Tabla 2, las biomasas se diluyeron a 58 g/L de concentración de biomasa bacteriana. Se realizó la alcalinización con NaOH 0,4 M. La lisis se incubó durante 7 días a 35-40°C bajo agitación continua. PSS: 97,7 mg/mL; Prot: 42,4 mg/mL.
- Ejemplo 2.6
- 20 De acuerdo con la Tabla 2, las biomasas se diluyeron a 92 g/L de concentración de biomasa bacteriana. Se realizó la alcalinización con NaOH 0,4 M. La lisis se incubó durante 7 días a 35-40°C bajo agitación continua. PSS: 153,0 mg/mL; Prot: 78,9 mg/mL.
- Ejemplo 2.7
- 25 De acuerdo con la Tabla 2, las biomasas se diluyeron a 58 g/L de concentración de biomasa bacteriana. Se realizó la alcalinización con NaOH 0,4 M. La lisis se incubó durante 3 días a 35-40°C bajo agitación continua. PSS: 98,6 mg/mL; Prot: 29,6 mg/mL.
- Ejemplo 2.8
- De acuerdo con la Tabla 2, las biomasas se diluyeron a 92 g/L de concentración de biomasa bacteriana. Se realizó la alcalinización con NaOH 0,4 M. La lisis se incubó durante 3 días a 35-40°C bajo agitación continua. PSS: 127,4 mg/mL; Prot: 60 mg/mL.
- 30 Ejemplo 2.9
- De acuerdo con la Tabla 2, las biomasas se diluyeron a 43 g/L de concentración de biomasa bacteriana. Se realizó la alcalinización con NaOH 0,2 M. La lisis se incubó durante 168 horas a 35-40°C bajo agitación continua. PSS: 43,2 mg/mL; Prot: 8,2 mg/mL.
- Ejemplo 2.10
- 35 De acuerdo con la Tabla 2, las biomasas se diluyeron a 57 g/L de concentración de biomasa bacteriana. Se realizó la alcalinización con NaOH 0,4 M. La lisis se incubó durante 3 días a 35-40°C bajo agitación continua. PSS: 69,5 mg/mL; Prot: 20,2 mg/mL.
- Ejemplo 2.11
- 40 De acuerdo con la Tabla 2, las biomasas se diluyeron a 30 g/L de concentración de biomasa bacteriana. Se realizó la alcalinización con NaOH 1M. La lisis se incubó durante 3 días a 35-40°C bajo agitación continua. PSS: 86,9 mg/mL; Prot: 13 mg/mL.
- Ejemplo 2.12
- 45 De acuerdo con la Tabla 2, las biomasas se diluyeron a 27 g/L de concentración de biomasa bacteriana. Se realizó la alcalinización con NaOH 1M. La lisis se incubó durante 3 días a 35-40°C bajo agitación continua. PSS: 91,3 mg/mL; Prot: 11,8 mg/mL.
- Ejemplo 2.13
- De acuerdo con la Tabla 2, las biomasas se diluyeron a 14 g/L de concentración de biomasa bacteriana. Se realizó la alcalinización con NaOH 0,1 M. La lisis se incubó durante 1 día a 35-40°C bajo agitación continua. PSS: 25,2

mg/mL; Prot: 5,8 mg/mL.

Ejemplo 2.14

5 De acuerdo con la Tabla 2, las biomosas se diluyeron a 14 g/L de concentración de biomasa bacteriana. Se realizó la alcalinización con NaOH 0,2 M. La lisis se incubó durante 3 días a 35-40°C bajo agitación continua. PSS: 26,6 mg/mL; Prot: 5,7 mg/mL.

Ejemplo 2.15

De acuerdo con la Tabla 2, las biomosas se diluyeron a 14 g/L de concentración de biomasa bacteriana. Se realizó la alcalinización con NaOH 0,1 M. La lisis se incubó durante 10 días a 35-40°C bajo agitación continua. PSS: 20,0 mg/mL; Prot: 2,1 mg/mL.

10 Ejemplo 2.16

De acuerdo con la Tabla 2, las biomosas se diluyeron a 114 g/L de concentración de biomasa bacteriana. Se realizó la alcalinización con NaOH 1M. La lisis se incubó durante 1 día a 35-40°C bajo agitación continua. PSS: 163,3 mg/mL; Prot: 68,4 mg/mL.

Ejemplo 2.17

15 De acuerdo con la Tabla 2, las biomosas se diluyeron a 114 g/L de concentración de biomasa bacteriana. Se realizó la alcalinización con NaOH 0,4 M. La lisis se incubó durante 3 días a 35-40°C bajo agitación continua. PSS: 163,0 mg/mL; Prot: 60,3 mg/mL.

Ejemplo 2.18

20 De acuerdo con la Tabla 2, las biomosas se diluyeron a 114 g/L de concentración de biomasa bacteriana. Se realizó la alcalinización con NaOH 1M. La lisis se incubó durante 10 días a 35-40°C bajo agitación continua. PSS: 171,2 mg/mL; Prot: 71,0 mg/mL.

Ejemplo 2.19

25 De acuerdo con la Tabla 2, las biomosas se diluyeron a 25 g/L de concentración de biomasa bacteriana. Se realizó la alcalinización con NaOH 0,45 M. La lisis se incubó durante 4 días a 35-40°C bajo agitación continua. PSS: 48,5 mg/mL; Prot: 15,2 mg/mL; A.A: 4,0 mg/mL; Azúcar: 0,86 mg/mL.

Ejemplo 2.20

De acuerdo con la Tabla 2, las biomosas se diluyeron a 28 g/L de concentración bacteriana de biomasa. Se realizó la alcalinización con NaOH 0,6 M. La lisis se incubó durante 4 días a 35-40°C bajo agitación continua. PSS: 59,4 mg/mL; Prot: 16,8 mg/mL; A.A: 5,4 mg/mL; Azúcar: 1,22 mg/mL.

30 Ejemplo 2.21

De acuerdo con la Tabla 2, las biomosas se diluyeron a 58 g/L de concentración bacteriana de biomasa. Se realizó la alcalinización con NaOH 0,2 M. La lisis se incubó durante 4 días a 35-40°C bajo agitación continua. PSS: 64,4 mg/mL; Prot: 32,4 mg/mL; A.A: 5,6 mg/mL; Azúcar: 1,84 mg/mL.

Ejemplo 2.22

35 De acuerdo con la Tabla 2, las biomosas se diluyeron a 56 g/L de concentración bacteriana de biomasa. Se realizó la alcalinización con NaOH 0,2 M. La lisis se incubó durante 3 días a 35-40°C bajo agitación continua. PSS: 61,0 mg/mL; Prot: 30,0 mg/mL; A.A: 5,6 mg/mL; Azúcar: 1,88 mg/mL.

Ejemplo 2.23

40 De acuerdo con la Tabla 2, las biomosas se diluyeron a 39 g/L de concentración bacteriana de biomasa. Se realizó la alcalinización con NaOH 0,7 M. La lisis se incubó durante 4 días a 35-40°C bajo agitación continua. PSS: 78,32 mg/mL; Prot: 20,60 mg/mL; A.A: 7,8 mg/mL; Azúcar: 1,54 mg/mL.

Ejemplo 2.24

45 Se descongeló a la temperatura ambiente una alícuota de cada una de las siguientes cepas E82, E83, E084, E086, E087, E088, E9111, E 8603, E 8621, E 8622, E8623, E 026, E9119, E9707 y E9708 que contenían 1.810 g de peso seco bacteriano, a continuación se diluyó con agua purificada para alcanzar 25 g/L de biomasa bacteriana (peso seco). Se realizó una alcalinización con hidróxido de sodio 1,0 M. El pH se midió después de 2 horas de lisis y fue de 13,5. Después, la lisis se incubó durante 72 horas a 35-40°C bajo agitación continua. Después de la incubación, el pH se ajustó a 11,4 con HCl concentrado. (Peso seco soluble); PSS: 75,4 mg/mL; Prot: 14,8 mg/mL; A.A: 5,4 mg/mL;

ES 2 664 990 T3

Azúcar: 0,9 mg/mL.

Tabla 2: Composición de lisis de *E. coli*

	E81 ejemplo 1.2	E82 ejemplo 1.3	E83 ejemplo 1.4	E84 ejemplo 1.5	E85 ejemplo 1.6	E86 ejemplo 1.7	E87 ejemplo 1.8	E88 ejemplo 1.9	E89 ejemplo 1.10	E8603 ejemplo 1.11	E8621 ejemplo 1.12	E8622 ejemplo 1.13	E8623 ejemplo 1.14	E9026 ejemplo 1.15	E9111 ejemplo 1.16	E9119 ejemplo 1.17	E9707 ejemplo 1.18	E9708 ejemplo 1.19	E9111 ejemplo 1.20
2.3															x				
2.4							x												
2.5															x				
2.6							x												
2.7										x	x	x	x	x		x	x	x	
2.8	x	x	x	x	x	x	x	x	x										
2.9																			x
2.10																			x
2.11										x	x	x	x	x		x	x	x	
2.12	x	x	x	x	x	x	x	x	X										
2.13	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
2.14	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
2.15	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
2.16	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
2.17	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
2.18	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
2.19	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
2.20	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
2.21	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
2.22	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
2.23	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	

Ejemplo 3: mezclas de productos lisados

Se mezclaron varios extractos bacterianos y se ajustó el pH, con los resultados siguientes:

5 Ejemplo 3.1

Se mezclaron 0,845 kg de *E. coli* Ejemplo 2.4 con 1,4 kg de *E. coli* Ejemplo 2.3. La mezcla se diluyó con agua purificada hasta 12 kg. La mezcla de producto lisado bacteriano diluido se transfirió a un tanque de microfiltración. Los resultados analíticos fueron Peso seco soluble (PSS): 29,7 mg/mL; Prot: 10,0 mg/mL.

Ejemplo 3.2

10 Se mezclaron 1,4 kg de *E. coli*, Ejemplo 2.7 con 0,85 kg de *E. coli*, Ejemplo 2.8. La mezcla se diluyó con agua purificada hasta 12 kg. La mezcla de producto lisado bacteriano diluido se transfirió a un tanque de microfiltración. Los resultados analíticos fueron Peso seco soluble (PSS): 32,3 mg/mL; Prot: 10,3 mg/mL. El PSS se midió como se describe en el Ejemplo 2. La concentración de proteína se midió mediante un análisis de Lowry (véase Farmacopea Europea 2.5.33, en "total protein - method 2").

15

Ejemplo 3.3

Se mezclaron 1,4 kg de E. coli, Ejemplo 2.5 con 0,86 kg de E. coli, Ejemplo 2.6. La mezcla se diluyó con agua purificada hasta 12 kg. La mezcla de producto lisado bacteriano diluido se transfirió a un tanque de microfiltración. Los resultados analíticos fueron PSS: 26,8 mg/mL; Prot: 9,6 mg/mL.

5 Ejemplo 3.4

Se mezclaron 2,4 kg de E. coli, Ejemplo 2.7 con 1,5 kg de E. coli, Ejemplo 2.8. La mezcla se diluyó con agua purificada hasta 20 kg. La mezcla de producto lisado bacteriano diluido se transfirió al tanque de microfiltración. Los resultados analíticos fueron PSS: 22,0 mg/mL; Prot: 9,5 mg/mL.

Ejemplo 3.5

10 Se diluyeron 9,0 kg de E. coli, Ejemplo 2.9 con agua purificada hasta 9,3 kg. La mezcla de producto lisado bacteriano diluido se transfirió al tanque de microfiltración. Los resultados analíticos son PSS: 45,7 mg/mL; Prot: 20,6 mg/mL.

Ejemplo 3.6

15 Se diluyeron 8,1 kg de E. coli, Ejemplo 2.10 con agua purificada hasta 12 kg. La mezcla de producto lisado bacteriano diluido se transfirió al tanque de microfiltración. Los resultados analíticos fueron PSS: 39,7 mg/mL; Prot: 17,3 mg/mL.

Ejemplo 3.7

20 Se mezclaron 3,2 kg de E. coli, Ejemplo 2.11 con 3,2 kg de E. coli, Ejemplo 2.12. La mezcla se diluyó con agua purificada hasta 12,8 kg. La mezcla de producto lisado bacteriano diluido se transfirió al tanque de microfiltración. Los resultados analíticos fueron PSS: 39,9 mg/mL; Prot: 8,0 mg/mL.

Ejemplo 3.8

25 Se diluyeron 248 kg de E. coli, Ejemplo 2.19 con agua purificada hasta 400 kg. La mezcla de producto lisado bacteriano diluido se transfirió al tanque de microfiltración. Los resultados analíticos son PSS: 31,6 mg/mL; Prot: 10,2 mg/mL; aminoácidos libres (A.A.): 2,6 mg/mL; Azúcar: 0,59 mg/mL. La concentración de azúcar se analizó después de la hidrólisis ácida y la derivatización de acuerdo con D. Herbert y otros, Meth. Microbiol. 5B: 266 et seq. (1971). La concentración de aminoácidos libres se midió convirtiendo aminoácidos en derivados de isoindol y midiendo la absorbancia a 340 nm, de acuerdo con Roth M., Fluorescence reaction for aminoacids, Anal.Chem., 43, 880-882, (1971). Los resultados se expresan en equivalentes de ácido glutámico.

Ejemplo 3.9

30 Se diluyeron 248 kg de E. coli, Ejemplo 2.20 con agua purificada hasta 400 kg. La mezcla de producto lisado bacteriano diluido se transfirió al tanque de microfiltración. Los resultados analíticos son PSS: 38,9 mg/mL; Prot: 10,8 mg/mL; A.A.: 3,6 mg/mL; Azúcar: 0,74 mg/mL.

Ejemplo 3.10

35 Se diluyeron 247 kg de E. coli, Ejemplo 2.21 con agua purificada hasta 400 kg. La mezcla de producto lisado bacteriano diluido se transfirió al tanque de microfiltración. Los resultados analíticos fueron PSS: 40,08 mg/mL; Prot: 20,0 mg/mL; A.A.: 3,6 mg/mL; Azúcar: 1,17 mg/mL.

Ejemplo 3.11

40 Se diluyeron 247 kg de E. coli, Ejemplo 2.22 con agua purificada hasta 400 kg. La mezcla de producto lisado bacteriano diluido se transfirió al tanque de microfiltración. Los resultados analíticos fueron PSS: 43,9 mg/mL; Prot: 19,1 mg/mL; aminoácidos (A.A.): 3,9 mg/mL; Azúcares: 1,27 mg/mL.

Ejemplo 3.12

Se mezclaron 1,9 kg de E. coli, Ejemplo 2.21 con 6 kg de E. coli, Ejemplo 2.23. La mezcla se diluyó con agua purificada hasta 12 kg. La mezcla de producto lisado bacteriano diluido se transfirió al tanque de microfiltración. Los resultados analíticos fueron PSS: 45,4 mg/mL; Prot: 12,6 mg/mL; A.A.: 3,8 mg/mL; Azúcar: 0,82 mg/mL.

45 Ejemplo 3.13

Se mezclaron 4 kg de E. coli, Ejemplo 2.21 con 4 kg de E. coli, Ejemplo 2.23. La mezcla se diluyó con agua purificada hasta 12 kg. La mezcla de producto lisado bacteriano diluido se transfirió al tanque de microfiltración. Los resultados analíticos fueron PSS: 47,0 mg/mL; Prot: 15,0 mg/mL; A.A.: 3,9 mg/mL; Azúcar: 1,14 mg/mL.

Ejemplo 3.14

Se mezclaron 72,4 kg de E. coli, Ejemplo 2.1, con 185,2 kg de E. coli, Ejemplo 2.2. La mezcla se diluyó con agua purificada hasta 400 kg. La mezcla de producto lisado bacteriano diluido se transfirió al tanque de microfiltración. Los resultados analíticos fueron PSS: 40,8 mg/mL; Prot: 17,7 mg/mL; A.A.: 3,7 mg/mL; Azúcar: 1,24 mg/mL.

5 Ejemplo 3.15

Se mezclaron 75,4 kg de E. coli, Ejemplo 2.24 con 185,2 kg de E. coli, Ejemplo 2.2. La mezcla se diluyó con agua purificada hasta 400 kg. La mezcla de producto lisado bacteriano diluido se transfirió al tanque de microfiltración. Los resultados analíticos fueron PSS: 43,6 mg/mL; Prot: 17,0 mg/mL; A.A.: 3,3 mg/mL; Azúcar: 1,16 mg/mL.

Ejemplo 4: Purificación de productos lisados

10 Ejemplo 4.1

La mezcla de producto lisado bacteriano del Ejemplo 3.1 se transfirió a un tanque de microfiltración (MF). La unidad de microfiltración (MF) utilizó un filtro de filtración de flujo tangencial (FFT) de 0,45 micras (PALL Procette) en modo serpentín o un filtro Schleicher & Schuell en modo paralelo. (Véase la Figura 1 para ver un diagrama de ejemplo de una configuración de FFT.) El flujo cruzado, para el modo de serpentín, se ajustó a 2.000 L/h m² (LHM) y la Presión Transmembrana (PTM) a 1,3 bares. El permeato se transfirió a un tanque de ultrafiltración (UF).

Una vez que el volumen del producto lisado en el tanque de microfiltración hubo alcanzado la mitad del volumen inicial, se inició la unidad de UF. El flujo cruzado se ajustó a 1.500 LHM y la PTM a 0,3 bares. Los volúmenes de los tanques tanto del MF (el Volumen inicial de MF se denomina ViMF) como de UF se mantuvieron en el mismo nivel. En cada volumen de diafiltración (que corresponde a ViMF), la extracción de proteína fue seguida por una medida de proteínas mediante el análisis de microplaca de Bradford. Mediante esta medida, se definió el número de ciclos de extracción para extraer todos los compuestos solubilizados.

Después de 10 volúmenes de diafiltración, se detuvo la UF y el producto lisado bacteriano se concentró en los tanques de MF. El volumen recuperado fue de 9,55 kg. Ese producto se diluyó a continuación a 7,0 mg/mL y después se filtró a través de un filtro estéril de 0,2 micras. Peso seco soluble (PSS): 24,2 mg/mL; Prot: 6,4 mg/mL. A.A.: 1,3 mg/mL, azúcar: 0,5 mg/mL. Porcentaje de D-aminoácido: 29% D-Ala, 4% D-Thr, 11% D-Leu, 45% D-Ser, 36% D-Asx, 29% D-Met, 26% D-Phe, 21% D-Glx, 25% D-Tyr, 9% D-Lys.

La producción de NOx (óxido nítrico macrófago) se midió después de una dilución de 20.000 veces (C1), 2.000 veces (C2) y 200 veces (C3) con los resultados siguientes: C1: 6,3 µM, C2: 7,4 µM, y C3: 13,1 µM.

Se filtraron varias mezclas adicionales por filtración de flujo tangencial (FFT) como se describe a continuación.

30 Ejemplo 4.2

El producto lisado del ejemplo 3.2 se transfirió a un tanque de MF. La instalación de FFT fue similar a la del ejemplo 4.1. El flujo cruzado, para el modo de serpentín se ajustó a 2.500 LHM y la PTM a 1,30 bares. La UF se detuvo después de 10 volúmenes de diafiltración y el flujo de permeato en el primer ciclo fue de 38,2 LHM. El rendimiento de extracción de peso en seco fue de 65%, el rendimiento de extracción de proteína fue de 80% y el rendimiento en volumen fue de 80%. El producto concentrado obtenido comprendía PSS: 26,1 mg/mL; Prot: 8,1 mg/mL; A.A.: 1,4 mg/mL; Azúcar: 0,6 mg/mL; ADN: 4,8 µg/mL. Porcentaje de D-aminoácido: 29% D-Ala, 4% D-Thr, 11% D-Leu, 45% D-Ser, 36% D-Asx, 29% D-Met, 26% D-Phe, 21% D-Glx, 25% D-Tyr, 9% D-Lys. Producción de NOx después de una dilución de 20.000 veces (C1), 2.000 veces (C2) y 200 veces (C3): C1: 5,5 µM, C2: 7,5 µM, C3: 5,5 µM.

Ejemplo 4.3

40 El producto lisado del ejemplo 3.3 se transfirió a un tanque de MF. La instalación de FFT fue similar a la del ejemplo 4.1. El flujo cruzado, para el modo de serpentín, se ajustó a 2.450 (L/h m²) LHM y la (Presión Trans membrana) PTM a 1,3 bares. La UF se detuvo después de 10 volúmenes de diafiltración y el flujo de permeato en el primer ciclo fue de 26,2 L/h.m². El rendimiento de extracción de peso en seco fue de 65%, el rendimiento de extracción de proteína fue de 75% y el rendimiento en volumen fue de 88%. El producto concentrado obtenido comprendía PSS: 24,5 mg/mL; Prot: 7,0 mg/mL; A.A.: 2,1 mg/mL; Azúcar: 0,5 mg/mL; ADN: 8,2 µg/mL. Porcentaje de D-aminoácido: 45% D-Ala, 11% D-Leu, 48% D-Ser, 44% D-Asx, 41% D-Met, 26% D-Phe, 25% D-Glx, 38% D-Tyr, 27% D-Lys. Producción de NOx después de una dilución de 20.000 veces (C1), 2.000 veces (C2) y 200 veces (C3): C1: 5.1 µM, C2: 6.8 µM, C3: 13.7 µM.

Ejemplo 4.4

50 El producto lisado del ejemplo 3.4 se transfirió a un tanque de MF. La instalación de FFT fue similar a la del ejemplo 4.1. El flujo cruzado, para el modo de serpentín se ajustó a 2000 (L/h m²) LHM y la Presión transmembrana) PTM a 1,8 bares. La UF se detuvo después de 10 volúmenes de diafiltración y el flujo de permeato en el primer ciclo fue de 22,5 L/h.m². El rendimiento de extracción de peso en seco fue de 67%, el rendimiento de extracción de proteína fue

de 84% y el rendimiento en volumen fue de 92%. El producto concentrado obtenido comprendía PSS: 21,5 mg/mL; Prot: 6,1 mg/mL; A.A.: 1,5 mg/mL; Azúcar: 0,3 mg/mL; ADN: 5,6 µg/ml. Porcentaje de D-aminoácido: 44% D-Ala, 15% D-Thr, 12% D-Leu, 48% D-Ser, 40% D-Asx, 40% D-Met, 30% D-Phe, 26% D-Glx, 31% D-Tyr, 18% D-Lys.

Ejemplo 4.5

- 5 El producto lisado del ejemplo 3.5 se transfirió a un tanque de MF. La instalación de FFT fue similar a la del ejemplo 4.1. El flujo cruzado, para el modo de serpentín se ajustó a 2.000 (L/h m²) LHM y la Presión transmembrana) PTM a 1,3 bares. La UF se detuvo después de 10 volúmenes de diafiltración y el flujo de permeato en el primer ciclo fue de 27,7 L/h.m². El rendimiento de extracción en peso seco fue de 72%, el rendimiento de extracción de proteína fue de 69% y el rendimiento en volumen fue de 86%. El producto concentrado obtenido comprendía PSS: 36,9 mg/mL; Prot: 16,9 mg/mL; A.A.: 2,8 mg/mL; Azúcar: 0,815 mg/mL; ADN: 46,7 µg/mL. Porcentaje de D-aminoácido: 27% D-Ala, 16% D-Thr, 11% D-Leu, 48% D-Ser, 40% D-Asx, 39% D-Met, 36% D-Phe, 32% D-Glx, 31% D-Tyr. Producción de NOx después de una dilución de 20.000 veces (C1), 2.000 veces (C2) y 200 veces (C3): C1: 6,2 µM, C2: 10,9 µM, C3: 18,3 µM.

Ejemplo 4.6

- 15 El producto lisado del ejemplo 3.6 se transfirió a un tanque de MF. La instalación de FFT fue similar a la del ejemplo 4.1. El flujo cruzado, para el modo de serpentín se ajustó a 2.000 (L/h m²) LHM y la (Presión transmembrana) PTM a 1,3 bares. La UF se detuvo después de 10 volúmenes de diafiltración y el flujo de permeato en el primer ciclo fue de 15,7 L/h.m². El rendimiento de extracción de peso seco fue de 53%, el rendimiento de extracción de proteína fue de 51% y el rendimiento en volumen fue de 81%. El concentrado obtenido comprendía PSS: 30,1 mg/mL; Prot: 12,7 mg/mL; A.A.: 2,6 mg/mL; Azúcar: 0,364 mg/mL. Porcentaje de D-aminoácido: 40% D-Ala, 16% D-Thr, 12% D-Leu, 49% D-Ser, 43% D-Asx, 44% D-Met, 40% D-Phe, 38% D-Glx, 36% D-Tyr, 24% D-Lys. Producción de NOx después de una dilución de 20.000 veces (C1), 2.000 veces (C2) y 200 veces (C3): C1: 5,8 µM, C2: 7,1 µM, C3: 15,1 µM.

Ejemplo 4.7

- 25 El producto lisado del ejemplo 3.7 se transfirió a un tanque de MF. La instalación de FFT fue similar a la del ejemplo 4.1. El flujo cruzado, para el modo de serpentín se ajustó a 2000 (L/h m²) LHM y la (Presión transmembrana) PTM a 1,35 bares. La UF se detuvo después de 10 volúmenes de diafiltración y el flujo de permeato en el primer ciclo fue de 30,0 L/h.m². El rendimiento de extracción de peso seco fue de 82%, el rendimiento de extracción de proteína fue de 83% y el rendimiento en volumen fue de 92%. El producto concentrado obtenido comprendía PSS: 38,2 mg/mL; Prot: 5,4 mg/mL. Producción de NOx después de una dilución de 20.000 veces (C1), 2.000 veces (C2) y 200 veces (C3): C1: 0,4 µM, C2: 2,1 µM, C3: 16,3 µM.

Ejemplo 4.8

- 35 Se centrifugaron 500 mL del producto lisado del ejemplo 2.13 durante 30 minutos a 9.000 g. A continuación el sobrenadante se filtró a través de filtros sucesivos con porosidades de 0,8 µm, 0,45 µm y 0,2 µm. El pH se ajustó a 10,5 con HCl. El rendimiento en volumen fue de 45%. El producto concentrado obtenido comprendía PSS: 25,21 mg/mL; Prot: 5,85 mg/mL; ADN: 7,5 µg/ml. Porcentaje de D-aminoácidos: 24% D-Ala, 16% D-Thr, 9% D-Leu, 43% D-Ser, 20% D-Asx, 16% D-Met, 10% D-Phe, 8% D-Glx, 7% D-Tyr.

Ejemplo 4.9

- 40 Se centrifugaron 500 mL del producto lisado del ejemplo 2.14 durante 30 minutos a 9000 g. A continuación el sobrenadante se filtró a través de filtros sucesivos con porosidades de 0,8 µm, 0,45 µm y 0,2 µm. El pH se ajustó a 10,5 con HCl. El rendimiento en volumen fue del 53%. El producto concentrado obtenido comprendía PSS: 26,62 mg/mL; Prot: 5,75 mg/mL; ADN: 6,5 µg/mL. Porcentaje de D-aminoácido: 35% D-Ala, 22% D-Thr, 10% D-Leu, 45% D-Ser, 35% D-Asx, 35% D-Met, 31% D-Phe, 24% D-Glx, 22% D-Tyr, 12% D-Lys. PBMC a 1 mg de peso seco activo/ml: IL-6: 9232 pg/ml.

Ejemplo 4.10

- 45 Se centrifugaron 500 mL del producto lisado del ejemplo 2.15 durante 30 minutos a 9.000 g. A continuación el sobrenadante se filtró a través de filtros sucesivos con porosidades de 0,8 µm, 0,45 µm y 0,2 µm. El pH se ajustó a 10,5 con HCl. El rendimiento en volumen fue del 53%. El producto concentrado obtenido comprendía PSS: 20 mg/mL; Prot: 2,13 mg/mL; ADN: 3,5 µg/mL. Porcentaje de D-aminoácidos: 35% D-Ala, 4% D-Thr, 11% D-Leu, 46% D-Ser, 34% D-Asx, 32% D-Met, 24% D-Phe, 24% D-Glx, 15% D-Tyr. Producción de NOx en mg de peso seco activo/mL: 0,01 mg/mL (C1), 0,1 mg/mL (C2) y 1,0 mg/mL (C3); C1: 3,6 µM, C2: 4,4 µM, C3: 7,9 µM.

Ejemplo 4.11

Se centrifugaron 500 mL del producto lisado del ejemplo 2.16 durante 30 minutos a 9.000 g. A continuación el sobrenadante se filtró a través de filtros sucesivos con porosidades de 0,8 µm, 0,45 µm y 0,2 µm. El pH se ajustó a 10,5 con HCl. El rendimiento en volumen fue 33%. El producto concentrado obtenido comprendía PSS: 163,33

mg/mL; Prot: 68,42 mg/mL; ADN: 14,1 µg/mL. Porcentaje de D-aminoácidos: 38% D-Thr, 1% D-Leu, 49% D-Ser, 43% D-Asx, 64% D-Met, 30% D-Phe, 31% D-Glx, 4% D-Tyr.

Ejemplo 4.12

5 Se centrifugaron 500 mL del producto lisado del ejemplo 2.17 durante 30 minutos a 9000 g. A continuación el sobrenadante se filtró a través de filtros sucesivos con porosidades de 0,8 µm, 0,45 µm y 0,2 µm. El pH se ajustó a 10,5 con HCl. El rendimiento en volumen fue del 17%. El producto concentrado obtenido comprendía PSS: 162,78 mg/mL; Prot: 60,26 mg/mL; ADN: 14,8 µg/mL. Porcentaje de D-aminoácido: 10% de D-Leu, 40% de D-Ser, 34% de D-Asx, 62% de D-Met, 27% de D-Phe, 23% de D-Glx, 5% de D-Tyr.

Ejemplo 4.13

10 Se centrifugaron 500 mL del producto lisado del ejemplo 2.18 durante 30 minutos a 9.000 g. A continuación el sobrenadante se filtró a través de filtros sucesivos con porosidades de 0,8 µm, 0,45 µm y 0,2 µm. El pH se ajustó a 10,5 con HCl. El rendimiento en volumen fue 13%. El producto concentrado obtenido comprendía PSS: 171,16 mg/mL; Prot: 71,02 mg/mL; ADN: 16,9 µg/mL.

Ejemplo 4.14

15 El producto lisado del ejemplo 3.8 se transfirió a un tanque de MF. La instalación de FFT fue similar a la del ejemplo 4.1. El flujo cruzado, para el modo de serpentín, se ajustó a 2.300 (L/h m²) LHM y la presión transmembrana) PTM a 1,5 bares. La UF se detuvo después de 11 volúmenes de diafiltración y el flujo de permeato en el primer ciclo fue de 32,5 L/h.m². El rendimiento de extracción de peso seco fue de 86%, el rendimiento de extracción de proteína fue de 87% y el rendimiento en volumen fue de 90%. El producto concentrado obtenido comprendía PSS: 26,6 mg/mL; Prot: 8,1 mg/mL; A.A.: 2,3 mg/mL; Azúcar: 0,42 mg/mL; ADN: 68,5 µg/mL. PBMC a 1 mg de peso seco activo/ml: IL-6: 29.898 pg/ml, IL-10: 446 pg/ml, TNF-α: 3.429 pg/ml. Producción de NOx en mg de peso seco activo/mL: 0.02 mg/mL (C1), 0.2 mg/mL (C2) y 2.0 mg/mL (C3); C1: 2,3 µM, C2: 16,6 µM, C3: 4,0 µM.

20

Ejemplo 4.15

25 El producto lisado del ejemplo 3.9 se transfirió a un tanque de MF. La instalación de FFT fue similar a la del ejemplo 4.1. El flujo cruzado, para el modo de serpentín se ajustó a 2.375 (L/h m²) LHM y la presión transmembrana) PTM a 1,3 bares. La UF se detuvo después de 10 volúmenes de diafiltración y el flujo de permeato en el primer ciclo fue de 32,5 L/h.m². El rendimiento de extracción de peso en seco fue de 83%, el rendimiento de extracción de proteína fue de 79% y el rendimiento en volumen fue de 92%. El producto concentrado obtenido comprendía PSS: 24,9 mg/mL; Prot: 7,2 mg/mL; A.A.: 2,3 mg/mL; Azúcar: 0,49 mg/mL. PBMC a 1 mg de peso seco activo/ml: IL-6: 23.709 pg/ml, IL-10: 385 pg/ml, TNF-α: 2.917 pg/ml. Producción de NOx en mg de peso seco activo/mL: 0.02 mg/mL (C1), 0,2 mg/mL (C2) y 2,0 mg/mL (C3); C1: 1,1 µM, C2: 13,8 µM, C3: 4,2 µM.

30

Ejemplo 4.16

35 El producto lisado del ejemplo 3.10 se transfirió a un tanque de MF. La instalación de FFT fue similar a la del ejemplo 4.1. El flujo cruzado, para el modo de serpentín, se ajustó a 2.500 (L/h m²) LHM y la presión transmembrana) PTM a 1,0 bares. La UF se detuvo después de 10 volúmenes de diafiltración y el flujo de permeato en el primer ciclo fue de 15,0 L/h.m². El rendimiento de extracción de peso seco fue de 58%, el rendimiento de extracción de proteína fue de 59% y el rendimiento en volumen fue de 79%. El producto concentrado obtenido comprendía PSS: 22,0 mg/mL; Prot: 8,1 mg/mL; A.A.: 1,6 mg/mL; Azúcar: 0,46 mg/mL; ADN: 23,9 µg/mL. PBMC a 1 mg de peso seco activo/ml: IL-6: 21.458 pg/ml, IL-10: 281 pg/ml, TNF-α: 123 pg/ml. Producción de NOx en mg de peso seco activo/mL: 0,02 mg/mL (C1), 0,2 mg/mL (C2) y 2,0 mg/mL (C3); C1: 14,6 µM C2: 23,8 µM, C3: 16,9 µM. Porcentaje de D-aminoácidos: 27% D-Ala, 22% D-Thr, 11% D-Leu, 44% D-Ser, 27% D-Asx, 26% D-Met, 22% D-Phe, 16% D-Glx, 15% D-Tyr, 8% D-Lys.

40

Ejemplo 4.17

45 El producto lisado del ejemplo 3.11 se transfirió a un tanque de MF. La instalación de FFT fue similar a la del ejemplo 4.1. El flujo cruzado, para el modo de serpentín, se ajustó a 2.500 (L/h m²) LHM y la presión transmembrana) PTM a 1,0 bares. La UF se detuvo después de 10 volúmenes de diafiltración y el flujo de permeato en el primer ciclo fue de 17,5 L/h.m². El rendimiento de extracción de peso en seco fue de 69%, el rendimiento de extracción de proteína fue de 69% y el rendimiento en volumen fue de 78%. El producto concentrado obtenido comprendía PSS: 22,2 mg/mL; Prot: 8,3 mg/mL; A.A.: 1,8 mg/mL; Azúcar: 0,5 mg/mL; ADN: 33,3 µg/mL. PBMC a 1 mg de peso seco activo/ml: IL-6: 19.304 pg/ml, IL-10: 343 pg/ml, TNF-α: 220 pg/ml. Producción de NOx en mg de peso seco activo/mL: 0,02 mg/mL (C1), 0,2 mg/mL (C2) y 2,0 mg/mL (C3); C1: 14,4 µM C2: 20,5 µM C3: 18,9 µM. Porcentaje D-aminoácidos: 30% D-Ala, 18% D-Thr, 10% D-Leu, 44% D-Ser, 29% D-Asx, 28% D-Met, 23% D-Phe, 18% D-Glx, 18% D-Tyr, 11% D-Lys.

50

55 Se neutralizaron setenta litros de la forma líquida con 196 mL de HCl al 25% y a continuación se mezclaron con 10,44 kg de manitol. Después la mezcla se liofilizó. Durante el ciclo de liofilización, el producto se congeló a -50°C y después se calentó a -25°C. La presión en el liofilizador se mantuvo entre 0,2 y 0,5 mbar y se controló mediante inyecciones de aire filtrado. A continuación, en la desecación secundaria, el producto se calentó hasta su

temperatura final de liofilización (+30°C) mientras se mantenía un nivel de vacío por debajo de 0,2 mbares. Cuando se completó el ciclo de liofilización, se restableció la presión normal en el liofilizador con aire filtrado. El producto liofilizado se cribó a través de un tamiz vibratorio ajustado. Se recuperaron 11,95 kg de producto liofilizado.

Ejemplo 4.18

- 5 Se centrifugaron 500 mL del producto lisado del ejemplo 3.13 durante 30 minutos a 9.000 g. A continuación el sobrenadante se filtró a través de filtros sucesivos con porosidades de 0,8 µm, 0,45 µm y 0,2 µm. El pH se ajustó a 10,5 con HCl. El producto concentrado obtenido comprendía PSS: 42,8, mg/mL; Prot: 12,5 mg/mL; A.A.: 3,5 mg/mL; Azúcar: 1,13 mg/mL; ADN: 14,1 µg/mL. Producción de NOx después de una dilución de 20.000 veces (C1), 2.000 veces (C2) y 200 veces (C3): C1: 0,4 µM C2: 5,7 µM, C3: 25.1 µM. PBMC para volumen diluido mL de producto
- 10 concentrado: Dilución 100: IL-6: 2101 pg/ml. Porcentaje de D-aminoácido: 25% D-Ala, 12% D-Thr, 10% D-Leu, 45% D-Ser, 35% D-Asx, 35% D-Met, 29% D-Phe, 26% D-Glx.

Ejemplo 4.19

- 15 Se centrifugaron 500 mL del producto lisado del ejemplo 3.12 durante 30 minutos a 9.000 g. A continuación el sobrenadante se filtró a través de filtros sucesivos con porosidades de 0,8 µm, 0,45 µm y 0,2 µm. El pH se ajustó a 10,5 con HCl. El producto concentrado obtenido comprendía PSS: 38 mg/mL; Prot: 9,7 mg/mL; A.A.: 3,1 mg/mL; Azúcar: 0,82 mg/mL; ADN: 80,1 µg/ml. Producción de NOx después de una dilución de 20.000 veces (C1), 2.000 veces (C2) y 200 veces (C3): C1: 0,3 µM, C2: 2,6 µM, C3: 19,2 µM. PBMC para volumen diluido mL de producto
- concentrado: Dilución 100: IL-6: 2.802 pg/ml. Porcentaje de D-aminoácidos: 35% D-Ala, 25% D-Thr, 10% D-Leu, 46% D-Ser, 40% D-Asx, 38% D-Met, 34% D-Phe, 32% D-Glx, 32% D-Tyr, 24% D-Lys.

Ejemplo 4.20

- El producto lisado del ejemplo 3.14 se transfirió a un tanque de MF. La instalación de FFT fue similar a la del ejemplo 4.1. El flujo cruzado, para el modo de serpentín, se ajustó a 2.500 (L/h m²) LHM y la presión transmembrana) PTM a 1,2 bares. La UF se detuvo después de 13 volúmenes de diafiltración y el flujo de permeato en el primer ciclo fue de 16,0 L/h.m.². El rendimiento de extracción de peso seco fue de 64%, el rendimiento de extracción de proteína fue de
- 25 62% y el rendimiento en volumen fue de 78%. El producto concentrado obtenido comprendía PSS: 22,4 mg/mL; Prot: 8,7 mg/mL; A.A.: 1,8 mg/mL; Azúcar: 0,54 mg/mL; ADN: 39,1 µg/mL. Porcentaje de D-aminoácidos: 32% D-Ala, 18% D-Thr, PBMC a 1 mg de peso seco activo/mL: IL-6: 22.303 pg/mL, IL-10: 561 pg/ml, TNF-α: 336 pg/ml. Producción de NOx en mg de peso seco activo/mL: 0,02 mg/mL (C1), 0,2 mg/mL (C2), y 2,0 mg/mL (C3): C1: 11,3 µM, C2: 15,3 µM, C3: 13,5 µM. Porcentaje de D-aminoácidos: 32% D-Ala, 18% D-Thr, 10% D-Leu, 44% D-Ser, 26% D-Asx, 23%
- 30 D-Met, 17% D-Phe, 15% D-Glx, 14% D-Tyr, 9% D-Lys.

Ejemplo 4.21

- El producto lisado del ejemplo 3.15 se transfirió a un tanque de MF. La instalación de FFT fue similar a la del ejemplo 4.1. El flujo cruzado, para el modo de serpentín, se ajustó a 2.500 (L/h m²) LHM y la (presión transmembrana) PTM a 1,0 bares. La UF se detuvo después de 13 volúmenes de diafiltración y el flujo de permeato en el primer ciclo fue de 15,0 L/h.m². El rendimiento de extracción de peso seco fue de 69%, el rendimiento de extracción de proteína fue de 66% y el rendimiento en volumen fue de 77%. El producto concentrado obtenido comprendía PSS: 21,4 mg/mL; Prot: 7,6 mg/mL; A.A.: 1,6 mg/mL; Azúcar: 0,5 mg/mL; ADN: 25,9 µg/mL. Porcentaje de D-aminoácidos: 12,5% D-Ala, 3,4% Val, 16,6%, 65% D-Ser, 26,1% D-Asx, 18,8% D-Met, 15,6% D-Glx, 9,1 % D-Lys. Producción de NOx en mg de peso seco activo/mL: 0,02 mg/mL (C1), 0,2 mg/mL (C2) y 2,0 mg/mL (C3): C1: 10,3 µM, C2: 15,2 µM, C3:
- 40 12,3 µM .

La forma líquida se liofilizó como se describe en el ejemplo 4.17. El contenido de proteína (Lowry) fue: 44 mg de proteína por gramo de producto liofilizado. Producción de NOx en mg de peso seco activo/mL de producto liofilizado: 0,01 mg/mL (C1), 0,1 mg/mL (C2) y 1,0 mg/mL (C3): C1: 6,4 µM, C2: 12,9 µM, C3: 19,4 µM.

- 45 Las cápsulas se produjeron mezclando 50,4 kg de producto liofilizado con 64,68 kg de almidón 1500 PT, 2,52 kg de estearato de magnesio y 50,4 kg de manitol. Producción de NOx en mg de peso seco activo/mL de cápsulas: 0,01 mg/mL (C1), 0,1 mg/mL (C2) y 1,0 mg/mL (C3): C1: 6,8 µM, C2: 12,1 µM, C3: 19,1 µM.

Ejemplo 5

Ejemplo 5A: El efecto de la cantidad de "material de partida" sobre la actividad de los productos lisados bacterianos midió la secreción de IL-6 por PBMC humanas.

- 50 Preparación de PBMC humanas y cultivo celular:

La sangre periférica de donantes sanos (Centro de transfusión, Hospital Universitario, Ginebra) se centrifugó para obtener una capa leucocitaria. La capa leucocitaria se mezcló con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS, Sigma, Buchs, Suiza), se depositó en una capa sobre Ficoll Paque Plus (Amersham Pharmacia) a 1,077 g/ml y se centrifugó (2.800 rpm, 20°C, 25 minutos). Las células recogidas de la interfase se lavaron dos veces en HBSS a 800

rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente y las células sedimentadas se resuspendieron en HBSS. Los recuentos celulares se realizaron utilizando una célula Neubauer. Todos los cultivos celulares se realizaron en medio RPMI-1640 con un suplemento de penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL), L-glutamina (2 mmoles/L) y suero de ternera fetal al 10% (FCS), todos obtenidos de Sigma. Para la estimulación *in vitro*, las células se cultivaron a una concentración de 1×10^6 células viables/pocillo.

Estimulación y medición de IL-6 en sobrenadantes de cultivo:

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se incubaron a 37°C y en atmósfera con CO₂ al 5% con los productos de la invención se sometieron a ensayo a 0,25, 0,5, 1 y 2 mg/mL de "peso seco soluble, PSS" en medio de cultivo RPMI-1640.

Los sobrenadantes de los cultivos se recogieron después de 24 horas y la concentración de IL-6 se midió mediante un análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA) (Human IL-6 ELISA Set, BD OptEIA, San Diego, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El límite de detección fue de 10 pg de IL-6/mL. La actividad se sometió a ensayo por primera vez en el ensayo de PBMC. (Véase la Figura 2a y 2b, que muestra el efecto del incremento de la cantidad de "material de partida" (concentración de biomasa bacteriana expresada en gramos de peso seco por litro de producto lisado) de 12,5 g/L (Figura 2a) a 25 g/L (Figura 2b). La actividad de los extractos dependía de la cantidad del "material de partida" que sufría la lisis alcalina (12,5 g/L frente a 25 g/L). El porcentaje de NaOH (2% v/v) y el tiempo de lisis alcalina (72 h) fueron constantes. Las Figuras 3a y 3b muestran el efecto del incremento del material de partida de 25 g/L a 100 g/L. El tiempo de lisis alcalina se fijó en 168 h y el porcentaje de NaOH se fijó a 1%.

De acuerdo con las Figuras 2 y 3, cuanto mayor sea el nivel de "Material de partida", mayor será la actividad resultante.

Ejemplo 5B: Efecto de la duración de la lisis sobre la actividad de los productos de la invención en el ensayo de PBMC humanas.

El "Material de partida" fue de 12,5 g/L, y se trató con NaOH al 2% durante 24 h (Figura 4a) o 72 h (Figura 4b). De acuerdo con esas figuras, el tiempo de lisis más largo dio como resultado una actividad más baja.

Ejemplo 6: Efecto del porcentaje inicial de NaOH (v/v) sobre la actividad de los productos lisados bacterianos de la invención en el ensayo de óxido nítrico murino

Se sacrificaron ratones C57/BL6 macho de seis semanas (macho de seis semanas, calidad SPF, Charles Rivier, FR) por inhalación de CO₂. La cadera, el fémur y la tibia de la extremidad posterior se eliminaron. La médula ósea se extrajo de la luz inyectando medio de Eagle modificado de Dulbecco (DH) a través del hueso después de cortar ambas porciones terminales. Después del lavado, las células madre se resuspendieron (40.000 células/mL) en medio DH con un suplemento de suero de caballo al 20% y sobrenadante de células L929 al 30%. La suspensión celular se incubó durante 8 días en una incubadora a 37°C con CO₂ al 8% y atmósfera saturada de humedad. Los macrófagos se separaron a continuación con PBS enfriado con hielo, se lavaron y resuspendieron en medio DH con un suplemento de suero de ternera fetal (FCS) al 5%, aminoácidos y antibióticos (medio DHE). La densidad celular se ajustó a 700.000 células/mL. Las soluciones acuosas de los productos se diluyeron en serie en medio de DHE directamente en placas de microtitulación. Los productos se sometieron a ensayo por triplicado y cada placa de microtitulación comprendía un control negativo compuesto de medio. El volumen final en cada pocillo fue de 100 µL. Se añadieron 100 µL de la suspensión celular a los productos diluidos y las células se incubaron durante 22 h en una incubadora a 37°C, en CO₂ al 8% y una atmósfera saturada de humedad. Al final del período de incubación, se transfirieron 100 µl de sobrenadante a otra placa de microtitulación y se determinó la concentración de nitrito producido en cada sobrenadante mediante la ejecución de una reacción de Griess. Se añadieron 100 µl de reactivo de Griess (5 mg/mL de sulfanilamida + 0,5 mg/mL de hidrócloruro de N-(1-naftil)etilendiamina) en ácido fosfórico acuoso al 2,5% a cada pocillo. Las placas de microtitulación se leyeron con un espectrofotómetro (SpectraMax Plus, Molecular Devices) a 562 nm frente una referencia a 690 nm. La concentración de nitrito era proporcional al contenido de óxido nítrico que se estaba formando. El contenido de nitrito se determinó basándose en una curva patrón. Los resultados se proporcionaron en µM de óxido nítrico (NO) como valor medio ± desviación típica y se representaron como una curva de respuesta a la dosis.

En los ensayos que se muestran en la Figura 5, la cantidad de material de partida (25 g/L) y el tiempo de lisis (168 h) fueron similares, la variable sometida a ensayo fue la concentración de NaOH (1% en la Parte A frente a 4% en la Parte B) para obtener ambos productos lisados. Se observó una actividad menor cuando se utilizó NaOH al 4% (B en la Figura 5) frente a NaOH al 1% (A en la Figura 5), lo que sugiere una degradación dependiente de la dosis alcalina probable de moléculas similares a endotoxinas.

Dependiendo del material de partida, la concentración de NaOH y el tiempo de lisis, se pueden generar diferentes actividades inmunológicas en el ensayo de macrófagos con NO.

Ejemplo 7: Ensayo cromogénico del producto lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL)

Para determinar la presencia de moléculas similares a endotoxinas, se realizó un ensayo de LAL con el kit Chromogenic - LAL de Bio-Whittaker.

5 Este ensayo se basa en la activación por lipopolisacáridos (LPS) o productos de estructura comparable, mediante una cascada enzimática presente en LAL. Esta activación enzimática se demuestra por la división de un cromógeno unido a un péptido por una proteasa. La reacción enzimática se lleva a cabo a 37°C y la formación del cromógeno a lo largo del tiempo se mide a 405 nm. El tiempo necesario para alcanzar 0,2 unidades de D.O. se registra y la actividad endotóxica se calcula en relación con un patrón de LPS (curva patrón).

10 Los resultados de semejante experimento ilustrativo en extractos de acuerdo con la invención se expresan en la tabla a continuación en UE (unidades de endotoxina) en relación con una preparación normalizada de LPS de *E. coli* (1 UE corresponde a 0,09 equivalentes en ng de LPS).

Condiciones de lisis (tiempo de lisis, cantidad de material de partida, porcentaje inicial de NaOH)	UE/mL	equivalente en ng de LPS/mL
T = 24h - 12,5 g/L - NaOH al 2%	343 ± 6	22 ± 0,4
T = 24h - 12,5 g/L - NaOH al 1%	33.530 ± 176	2.163 ± 11
T = 24h - 25 g/L - NaOH al 2%	908 ± 5,1	58 ± 0,3
T = 24h - 50 g/L - NaOH al 4%	48 ± 0,4	3 ± 0,1
T = 24h - 50 g/L - NaOH al 3%	355 ± 11	23 ± 0,7
T = 72h - 12,5 g/L - NaOH al 2%	< 50	< 3
T = 72h - 25 g/L - NaOH al 3%	65 ± 0,9	4, ± 0,1
T = 72h - 50 g/L - NaOH al 2%	196 ± 6	13 ± 0,4
T = 72h - 50 g/L - NaOH al 3%	45 ± 3	3 ± 0,2
T = 72h-50 g/L-NaOH al 4%	162 ± 3	11 ± 0,2
T = 168h - 12,5 g/L - NaOH al 2%	26 ± 0,7	2 ± 0,1
T = 168h - 12,5 g/L - NaOH al 3%	45 ± 3	3 ± 0,2
T = 168h - 25 g/L - NaOH al 3%	25 ± 1	2 ± 0,04
T = 168h - 50 g/L - NaOH al 2%	55 ± 1	4 ± 0,04
T = 168h - 50 g/L - NaOH al 3%	1.035 ± 42	67 ± 2,7
T = 168h - 50 g/L - NaOH al 4%	46 ± 2	3 ± 0,1
Agua	< 0,005	< 0,0003

Ejemplo 8: Efecto de las realizaciones de la invención en un modelo de infección por *Escherichia coli* en tracto urinario en una cepa de ratones insensible a LPS

15 Las realizaciones de acuerdo con la invención se sometieron a ensayo en un modelo de infección por *E. coli* del tracto urinario en ratones insensibles a LPS. (Véase Hopkins et al., Inheritance of susceptibility to induced *Escherichia coli* bladder and kidney infections in female C3H/HeJ mice., *J Infect Dis.* 1 de febrero de 2003; 187(3): 418-23). Se trataron tres grupos de ratones hembra C3H/HeJ de 10-12 semanas de edad (8 ratones en cada grupo) por vía oral con uno de tres extractos diferentes (véase a continuación) durante 10 días antes de la infección por *E. coli*. Los ratones C3H/HeJ contienen una mutación en el gen TLR4 del receptor de tipo toll y son insensibles a los agonistas de TLR4, tales como los lipopolisacáridos (LPS). Por lo tanto, este modelo es adecuado para detectar los efectos de los fármacos que actúan a través de otras rutas además de TLR4.

20 Los ratones se mantuvieron durante el período de tratamiento en condiciones normales a temperatura ambiente de 18-26°C y una humedad relativa de 30 a 70%. El programa de iluminación se ajustó a un ciclo de luz y oscuridad de 12:12 horas. Los animales fueron alimentados con una dieta convencional proporcionada por los laboratorios Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN). Se proporcionará agua corriente ad libitum, a menos que se indique lo contrario.

Los tres extractos sometidos a ensayo fueron:

a) Un extracto obtenido por una fuerte lisis de 18 cepas de *E. coli*

b) Un extracto obtenido por una lisis moderada de 18 cepas de *E. coli*

c) Un extracto obtenido por una mezcla de a) y b) (1/4 y 3/4 respectivamente)

Se administraron veinticinco mg de extracto bacteriano a cada ratón por vía oral una vez al día durante 10 días consecutivos. Se inocularon intravesicalmente solución salina tamponada con fosfato (PBS) o la cepa 1677 de *E. coli* uropatógena a los ratones de acuerdo con un protocolo de inóculo mínimo que reduce la probabilidad de inoculación de los riñones asociada con el reflujo e induce infecciones en todos los animales inoculados. En estos experimentos se utilizó la cepa 1677 de *E. coli*, aislada de la orina de una mujer con ITU febril. Esta cepa es 06 y contiene genes para, por ejemplo, hemolisina, aerobactina, fimbrias P y fimbrias tipo 1, pero no para, por ejemplo, adhesina afimbrial I, factor necrotizante citotóxico 1 y fimbrias S. Para preparar el inóculo, las bacterias se cultivaron a partir de solución de partida congelada mediante 2 pases en caldo de triptosa (Difco Laboratories), se lavaron con PBS y se resuspendieron a una concentración de 2×10^{10} bacterias/mL. Los ratones se privaron de agua durante 1 hora y se extrajo orina de sus vejigas inmediatamente antes de la inoculación. Se instilaron diez microlitros de inóculo bacteriano en la vejiga mediante cateterización uretral bajo anestesia con isoflurano, lo que dio como resultado una dosis de 2×10^8 *E. coli* por ratón. Se dejó que los animales se recuperaran de la anestesia y se les administró agua de nuevo una hora más tarde.

Los ratones se sacrificaron 10 días después de la inoculación para evaluar las intensidades de las infecciones de vejiga y riñón. Se extrajeron la vejiga y los dos riñones de cada animal, se pesaron y se homogeneizaron en PBS estéril, después de lo cual los productos homogeneizados se sembraron en serie sobre agar eosina-azul de metileno de Levine (Difco Laboratories). Se contó el número de colonias de *E. coli* en cada placa después de la incubación durante la noche a 37°C y se utilizó para calcular el número total de bacterias en cada vejiga o par de riñones.

Se utilizó el ensayo de la diferencia menos significativa protegida de Fisher para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la unidad formadora de colonias (UFC) total media para diferentes grupos de ratones (PBS, grupo infectado no tratado, y grupo tratado e infectado). Los datos de infección de vejiga y riñón se transformaron utilizando $UFC \text{ total} = \log_{10} [(UFC + 100)/\text{mg de tejido}]$, donde UFC es el número total de unidades formadoras de colonias calculado por muestra de tejido.

Los resultados obtenidos se ilustran en las Figuras 6a y 6b, para vejiga y riñones, respectivamente. En resumen, los 3 productos lisados bacterianos sometidos a ensayo disminuyeron en un factor > 3 (vejiga) y > 2 (riñones) los valores logarítmicos obtenidos, lo que sugiere que el número de colonias cultivadas de la vejiga y los riñones disminuía al menos en un factor de 1.000 y 100 respectivamente. Como los resultados se generaron en ratones C3H/HeJ, los efectos observados son independientes de TLR4.

Ejemplo 9: Efecto de las realizaciones de la invención en un modelo murino de infección intraperitoneal por *Salmonella typhimurium* en una cepa de ratones sensible a LPS.

Tres extractos de la invención descritos en el Ejemplo 8 también se sometieron a ensayo en ratones C57/bl, que tienen una sensibilidad normal a LPS. Los tres extractos sometidos a ensayo fueron:

a) Un extracto obtenido por una fuerte lisis de 18 cepas de *E. coli*

b) Un extracto obtenido por una lisis moderada de 18 cepas de *E. coli*

c) Un extracto obtenido por una mezcla de a) y b) (1/4 y 3/4 respectivamente).

Se mantuvieron ratones C57BL/6 durante 7 días antes del tratamiento oral con las sustancias mencionadas anteriormente. El experimento consistió en 4 grupos experimentales: 3 grupos tratados con los compuestos de la invención y un grupo de control. Cada grupo experimental implicó 20 ratones. Los ratones en el grupo de control recibieron un tratamiento simulado utilizando la administración oral de 0,5 mL de agua diariamente durante 10 días. Para los otros grupos, los extractos se disolvieron diariamente en agua destilada para tener una sola dosis en un volumen final de 0,5 mL. Este volumen de 0,5 mL se administró a cada ratón por vía oral una vez al día durante 10 días consecutivos antes de que todos los ratones fueran expuestos a *Salmonella*. Se administraron 10 mg de extracto bacteriano a cada animal en cada administración.

Para la exposición, se inyectó por vía intraperitoneal una suspensión de *Salmonella typhimurium* cepa 415 (I. Mechnokov Institute for Vaccines and Sera, Russian Academy of Medical Sciences) en cada ratón.

Una exposición preliminar de búsqueda de dosis (no mostrada) varió desde 10^2 a 10^5 UFC de *Salmonella* por ratón. Se seleccionó una dosis de 10^4 UFC para el experimento principal, porque esta dosis proporcionó aproximadamente 50% de los supervivientes en animales no tratados. Después de la exposición, los ratones se mantuvieron en las condiciones convencionales para animales de laboratorio. La observación diaria y los registros de muerte se realizaron durante un período de 21 días después de la infección.

La eficacia antiinfecciosa de los compuestos (véanse las tablas a continuación) se estimó de acuerdo con la tasa de supervivencia post-infección (SR), la duración media de la vida después de la infección (ADL), el factor de defensa

ES 2 664 990 T3

(DF) y el índice de eficacia de la preparación (EI), que se calcularon para cada grupo experimental. La SR se tomó como un porcentaje de animales vivos en el grupo experimental el día 21 después de la infección. Se calcularon ADL, DF y EI utilizando las siguientes fórmulas:

$$ADL = (X1 + X2 + \dots + Xn) : N ,$$

- 5 donde ADL es la duración media de la vida, X1 a Xn son duraciones de vida después de la infección para los ratones experimentales núm. 1 a núm. n, y N es un número total de animales en el grupo experimental.

$$DF = CD : ED ,$$

donde DF es el factor de defensa, CD es un porcentaje de muerte en el grupo control, y ED es un porcentaje de muerte en el grupo experimental.

- 10
$$EI = [(DF - 1) : DF] \times 100\% ,$$

donde EI es el índice de eficacia de preparación y DF es el factor de defensa.

Registro de fallecimientos en grupos experimentales durante el período de 21 días después de la infección con 10^4 UFC de *Salmonella typhimurium*. Los mismos resultados también se representan en la Figura 7.

Pre-tratamiento	Número de ratones antes del desafío	Días después de la infección																				Muerte (%)	Tasa de supervivencia (%)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20			21
H ₂ O	19	-	-	-	1*	2	2	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	42	58
Fuerte	20	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	85	
Moderado	16	6	4	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	94	6	
Mezcla	20	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	10	90	

-*: El número de ratones encontrados muertos el día que se muestra.

Eficacia de defensa de los extractos en el modelo de infección letal por *Salmonella thyphimurium* en ratones C57BL/6.

Pretratamiento con sustancias	Índice de mortalidad (%)	Tasa de supervivencia (%)	ADL (días)	DF	EI (%)
H ₂ O	42	58	15,3	1	0
Fuerte	15	85	19,1	2,8	64
Moderado	94	6	3,3	Sin defensa	Sin eficacia
Mezcla	10	90	20,2	4,2	76

5 Los extractos (a) y (c) elaborados a partir de una fuerte lisis alcalina (fuerte) y de una mezcla de lisis fuertes y moderadas (mezcla) fueron bien tolerados. El extracto (b) elaborado a partir de una lisis moderada (moderado) demostró una toxicidad más alta que las otras. Se observó una disminución en el tamaño del cuerpo del ratón y retrasos en el crecimiento del ratón, aunque no se midió, en el grupo tratado con el extracto (b). Cuatro de 20 ratones en el grupo experimental (b) o "moderado" murieron durante el transcurso del tratamiento. Por lo tanto, solamente 16 ratones de este grupo fueron expuestos más tarde a *Salmonella*.

10 En el grupo de control de ratones pretratados con agua, la tasa de supervivencia durante el período de observación (21 días) fue de 58% y la ADL fue de 15,3 días. El extracto (b) parecía no proporcionar defensa contra la infección por *Salmonella*, y el extracto aceleró la muerte de los animales infectados. Específicamente, 90% de los ratones murieron el día 7 después de la infección, y la ADL fue de 3,3 días. La tasa de supervivencia en este grupo para el día 21 después de la infección fue tan baja como 6% (véanse las tablas anteriores y la figura 7).

15 Por el contrario, los extractos (a) y (c), elaborados a partir de una lisis fuerte (Fuerte) o de una mezcla de lisis fuertes y moderadas (Mezcla) aumentaron la resistencia de los ratones a la infección por *Salmonella thyphimurium*. Ambas sustancias mostraron una buena eficacia de protección. Específicamente, la tasa de supervivencia después de la exposición a extracto (c), (Mezcla), fue de 90%, mientras que con el extracto (a), (Fuerte), fue de 85% (tablas anteriores y Figura 7).

Ejemplos adicionales

20 Un extracto de todas las cepas bacterianas de *Escherichia coli* elegidas entre NCTC: 8603, 8621, 8622, 8623, 9026, 9111, 9119, 9707 y 9708, y I: 081, 082, 083, 084, 085, 086, 087, 088 y 089, en donde, durante la preparación del extracto, las cepas bacterianas se lisan a un pH superior a 12, y el extracto se trata para eliminar los ácidos nucleicos; y en donde el extracto no presenta un riesgo de enfermedades priónicas tras la administración a un paciente.

25 El extracto de cualquiera de los tres párrafos precedentes, en donde el extracto comprende menos de 100 µg/mL de ácido nucleico.

El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, en el que el extracto comprende al menos 0,3 mg/mL de sacáridos.

30 El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde al menos un sacárido se selecciona del grupo que consiste en monosacáridos, disacáridos y polisacáridos.

El extracto del párrafo precedente, en donde al menos un polisacárido es un polisacárido ramificado.

El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde al menos un sacárido está químicamente modificado.

35 El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde el extracto comprende entre 0,3 y 4,5 mg/mL de sacáridos.

El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde la lisis se realiza a un pH de 12,6 a 13,4.

El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde el extracto se obtiene por lisis durante un período de 30 a 120 horas con una biomasa de 15 a 80 g/L.

40 El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde el extracto se trata para eliminar los componentes particulados y/o insolubles.

El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde el extracto comprende entre 1,5 y 2,5 mg/mL de aminoácidos libres.

El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde cada cepa bacteriana se cultiva en un medio que no presenta un riesgo de enfermedades por priones.

El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde cada cepa bacteriana de la que deriva el extracto se cultiva en un medio vegetal o sintético.

- 5 El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde al menos un aminoácido elegido entre ácido aspártico, ácido glutámico, serina, histidina, alanina, arginina, tirosina, metionina, fenilalanina y lisina se racemiza en al menos 10%.

El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde los aminoácidos libres del extracto comprenden entre 1 y 80% de D-aminoácidos.

- 10 El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde los aminoácidos libres del extracto comprenden entre 10 y 45% de D-aminoácidos.

El extracto del párrafo precedente, en donde los aminoácidos libres del extracto comprenden entre un 25 y un 35% de D-aminoácidos.

- 15 El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde el extracto comprende al menos un D-aminoácido elegido entre ácido D-aspártico y D-asparagina, ácido D-glutámico y D-glutamina, D-serina, D-metionina, D-histidina, D-alanina, D-arginina, D-fenilalanina, D-tirosina, D-leucina, D-lisina, D-valina y D-treonina.

El extracto del párrafo precedente, en donde la concentración de cualquier D-aminoácido comprende entre 1 y 50% de la concentración de aminoácido libre.

- 20 El extracto del párrafo precedente, en donde la concentración de cualquier D-aminoácido comprende entre 10 y 40% de la concentración de aminoácidos libres.

El extracto del párrafo precedente, en donde la concentración de cualquier D-aminoácido comprende entre 15 y 35% de la concentración de aminoácido libre.

El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde el extracto comprende menos de 5.000 ng de equivalentes de LPS mediante un ensayo cromogénico de producto lisado de amebocitos de limulus (LAL).

- 25 El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde el extracto comprende entre 8 y 75 mg/mL de una o más proteínas.

El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde las una o más proteínas tienen pesos moleculares de menos de 30 kDa.

- 30 El extracto de cualquiera de los párrafos anteriores, en donde las una o más proteínas tienen pesos moleculares de menos de 10 kDa.

El extracto de cualquiera de los párrafos anteriores, en donde la tasa de supervivencia de al menos 8 ratones insensibles a LPS 13 días después de la exposición a la cepa 1677 de *E. coli* uropatógena es de al menos 70%, en donde la dosis de cepa 1677 de *E. coli* uropatógena se elige de modo que la tasa de supervivencia de al menos 8 ratones de control sea de 60% o inferior.

- 35 El extracto del párrafo precedente, en donde la tasa de supervivencia es de al menos 80%.

El extracto del párrafo anterior, en donde la tasa de supervivencia es al menos del 90%.

El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde la tasa de supervivencia de al menos 8 ratones con sensibilidad a LPS de tipo salvaje 13 días después de la exposición a *Salmonella thyphimurium* es al menos 70%, en donde la dosis de *Salmonella thyphimurium* se elige de manera que la tasa de supervivencia de al menos 8 ratones de control sea 60% o inferior.

- 40 El extracto del párrafo precedente, en donde la tasa de supervivencia es de al menos 80%.

El extracto del párrafo precedente, en donde la tasa de supervivencia es de al menos 80%.

El extracto del párrafo precedente, en donde la tasa de supervivencia es de al menos del 90%.

Una composición farmacéutica que comprende el extracto de cualquiera de los párrafos precedentes.

- 45 Un método para tratar a un sujeto que padece o está en riesgo de desarrollar un trastorno del tracto digestivo o urinario, que comprende administrar una cantidad eficaz de cualquiera de los extractos de los párrafos anteriores a dicho sujeto. El método de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde dicho sujeto es un ser humano.

El método de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde el trastorno del tracto digestivo o urinario se selecciona entre uretritis, nefritis tubulointersticial, pielonefritis obstructiva, infecciones del tracto urinario debidas a

uropatía obstructiva y de reflujo, cistitis incluyendo cistitis crónica, prostatitis incluyendo prostatitis crónica, prostatocistitis, enfermedades inflamatorias pélvicas femeninas, enfermedad de Crohn y síndrome del intestino irritable.

5 Un procedimiento para preparar un extracto a partir de una mezcla de todas las cepas bacterianas de *E. coli* seleccionadas entre NCTC: 8603, 8621, 8622, 8623, 9026, 9111, 9119, 9707 y 9708, y I: 081, 082, 083, 084, 085, 086, 087, 088 y 089 que comprende:

(a) cultivar cada cepa en un medio que no represente un riesgo de enfermedades priónicas;

(b) lisar cada cepa a un pH mayor de 12; y

10 (c) pasar el producto del apartado (b) al menos una vez a través de un microfiltro y al menos una vez a través de un ultrafiltro.

El procedimiento de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde la lisis se lleva a cabo a un pH inicial mayor de 12,5.

El procedimiento de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde la lisis se lleva a cabo a un pH inicial de 12,6 a 13,4.

15 El procedimiento de cualquiera de los párrafos anteriores, en donde la lisis se lleva a cabo a una concentración inicial de ion hidróxido de 0,1 N a 1,1 N.

El procedimiento de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde la lisis se lleva a cabo a una concentración inicial de ion hidróxido de 0,2 N a 1 N.

20 El procedimiento de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde la lisis se lleva a cabo durante un período de 20 horas a 10 días a 30-60°C.

El procedimiento de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde la lisis se lleva a cabo durante un período de 40 horas a 72 horas de 35°C a 40°C.

El procedimiento de cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el microfiltro es de 0,45 micras y el ultrafiltro es de 30 kDa.

25 El procedimiento de cualquiera de los párrafos anteriores, que comprende adicionalmente hacer pasar el producto del apartado (c) a través de un segundo microfiltro a 0,2 micras.

El procedimiento de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde la parte (c) se realiza por filtración de flujo tangencial.

El procedimiento del párrafo precedente, en donde la filtración de flujo tangencial se realiza durante 5 a 15 ciclos.

30 El procedimiento de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde la filtración de flujo tangencial se realiza como se establece en la Figura 1.

El procedimiento de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde la filtración de flujo tangencial se realiza como se establece en la Figura 1, en modo serpentín.

35 El procedimiento de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde la parte (b) se lleva a cabo con 10-120 g/L de peso seco bacteriano de material.

El procedimiento de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde la parte (b) se lleva a cabo con 15-80 g/L de peso seco bacteriano de material.

Un producto obtenido por cualquiera de los procedimientos de los párrafos precedentes.

40 Un método para tratar a un sujeto que padece o está en riesgo de desarrollar un trastorno del tracto digestivo o urinario, que comprende administrar una cantidad eficaz de cualquiera de los productos de uno cualquiera de los procedimientos de los párrafos precedentes a dicho sujeto.

El método del párrafo precedente en donde el sujeto es un ser humano.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un extracto que comprende producto lisado bacteriano de todas las cepas bacterianas de *Escherichia coli* elegidas entre NCTC: 8603, 8621, 8622, 8623, 9026, 9111, 9119, 9707, 9708, I: 081, 082, 083, 084, 085, 086, 087, 088 y 089, que conserva y/o retiene componentes lipopolisacáridos, obtenible lisando las cepas bacterianas a un pH inicial mayor de 12, en donde el extracto comprende al menos 0,3 mg/mL de sacáridos, menos de 100 µg/ml de ácidos nucleicos, entre 1,5 y 2,5 mg/mL de aminoácidos libres en equivalentes de ácido glutámico (147,1 g/mol) elegidos entre ácido aspártico, ácido glutámico, serina, histidina, alanina, arginina, tirosina, metionina, fenilalanina y lisina que está racemizado en al menos 10%, y en donde el extracto no representa un riesgo de enfermedades priónicas.
- 10 2. El extracto de la reivindicación 1, en donde el extracto comprende entre 0,3 y 4,5 mg/mL de sacáridos.
3. El extracto de la reivindicación 1, en donde al menos un sacárido, que puede ser un polisacárido ramificado, se selecciona del grupo que consiste en monosacáridos, disacáridos y polisacáridos.
4. El extracto de la reivindicación 3, en donde al menos un sacárido está químicamente modificado.
- 15 5. El extracto de la reivindicación 4, en donde cada cepa bacteriana a partir de la cual se obtiene el extracto se cultiva en un medio vegetal o sintético.
6. El extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde los aminoácidos libres en el extracto comprenden entre 1 y 80% de D-aminoácidos, preferiblemente entre 10 y 45% de D-aminoácidos, más preferiblemente entre 25 y 35% de D-aminoácidos.
- 20 7. El extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el extracto comprende al menos un D-aminoácido elegido entre ácido D-aspártico y D-asparagina, ácido D-glutámico y D-glutamina, D-serina, D-metionina, D-histidina, D-alanina, D-arginina, D-fenilalanina, D-tirosina, D-leucina, D-lisina, D-valina y D-treonina.
8. El extracto de la reivindicación 7, en donde la concentración de un D-aminoácido cualquiera está entre 1 y 50% de la concentración de aminoácidos libres, preferiblemente entre 10 y 40% de la concentración de aminoácidos libres, más preferiblemente entre 15 y 35% de la concentración de aminoácidos libres.
- 25 9. El extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el extracto comprende menos de 5.000 ng de equivalentes de LPS mediante un ensayo cromogénico de producto lisado de amebocitos de limulus (LAL).
10. El extracto de la reivindicación 9, en donde las una o más proteínas tienen pesos moleculares de menos de 30 kDa.
11. Una composición farmacéutica que comprende el extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
- 30 12. El uso del extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención del trastorno del tracto digestivo o urinario de un sujeto humano o un mamífero doméstico.
13. El extracto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para su uso en un método para el tratamiento y/o la prevención del trastorno del tracto digestivo o urinario de un sujeto humano o un mamífero doméstico.
- 35 14. El uso de la reivindicación 13, en donde el trastorno del tracto digestivo o urinario se elige entre uretritis, nefritis tubulointersticial, pielonefritis obstructiva, infecciones del tracto urinario debidas a uropatía obstructiva y de reflujo, cistitis incluyendo cistitis crónica, prostatitis incluyendo prostatitis crónica, prostatocistitis, enfermedades con inflamación pélvica femenina, enfermedad de Crohn y síndrome del intestino irritable.
- 40 15. El extracto para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el trastorno del tracto digestivo o urinario se elige entre uretritis, nefritis tubulointersticial, pielonefritis obstructiva, infecciones del tracto urinario debidas a uropatía obstructiva y de reflujo, cistitis incluyendo cistitis crónica, prostatitis incluyendo prostatitis crónica, prostatocistitis, enfermedades inflamatorias pélvicas femeninas, enfermedad de Crohn y síndrome del intestino irritable.
- 45 16. Un procedimiento para preparar un extracto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 a partir de una mezcla de todas las cepas de *E. coli* elegidas entre: NCTC: 8603, 8621, 8622, 8623, 9026, 9111, 9119, 9707 y 9708 e I: 081, 082, 083, 084, 085, 086, 087, 088 y 089 que comprende:
 - (a) cultivar cada cepa en un medio que no represente un riesgo de enfermedades priónicas;
 - (b) lisar cada cepa a un pH inicial mayor de 12; y
 - 50 (c) hacer pasar el producto del apartado (b) al menos una vez a través de un microfiltro y al menos una vez a través

de un ultrafiltro.

17. El procedimiento de la reivindicación 16, en donde la lisis se lleva a cabo a un pH inicial superior a 12,5, preferiblemente a un pH inicial de 12,6 a 13,4.
- 5 18. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 16-17, en donde al menos una parte de la lisis se lleva a cabo a una concentración inicial de ion hidróxido de 0,1 N a 1,1 N, preferiblemente a una concentración inicial de ion hidróxido de 0,2 N a 1 N.
19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 16-18, en donde al menos una parte de la lisis se lleva a cabo durante un período de 30 a 50 horas de 30 a 40°C, preferiblemente durante un período de 60 a 120 horas de 30 a 40°C.
- 10 20. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 16-19, en donde el microfiltro es de 0,45 micras y el ultrafiltro es de 30 kDa.
21. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 16-20, que comprende adicionalmente hacer pasar el producto del apartado (c) a través de un segundo microfiltro a 0,2 micrómetros.
- 15 22. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 16-21, en donde la parte (c) se realiza mediante filtración de flujo tangencial, preferiblemente realizada durante 5 a 15 ciclos.
23. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 16-22, en donde la parte (b) se lleva a cabo con 10-120 g/L de peso seco de material bacteriano.

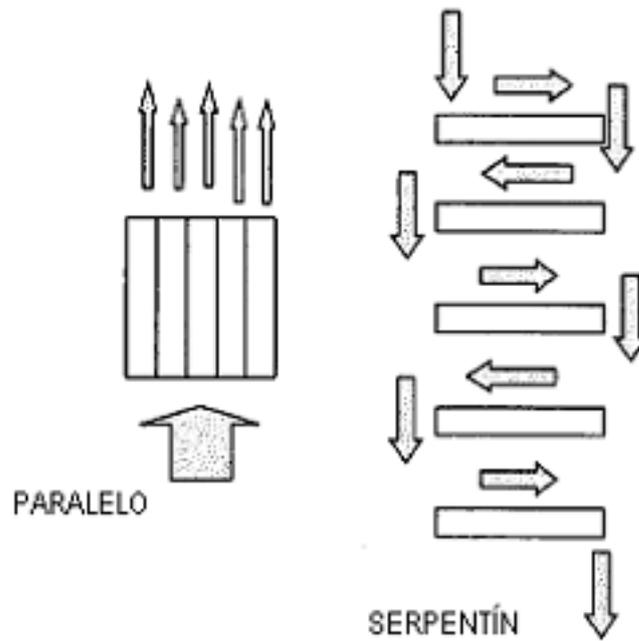
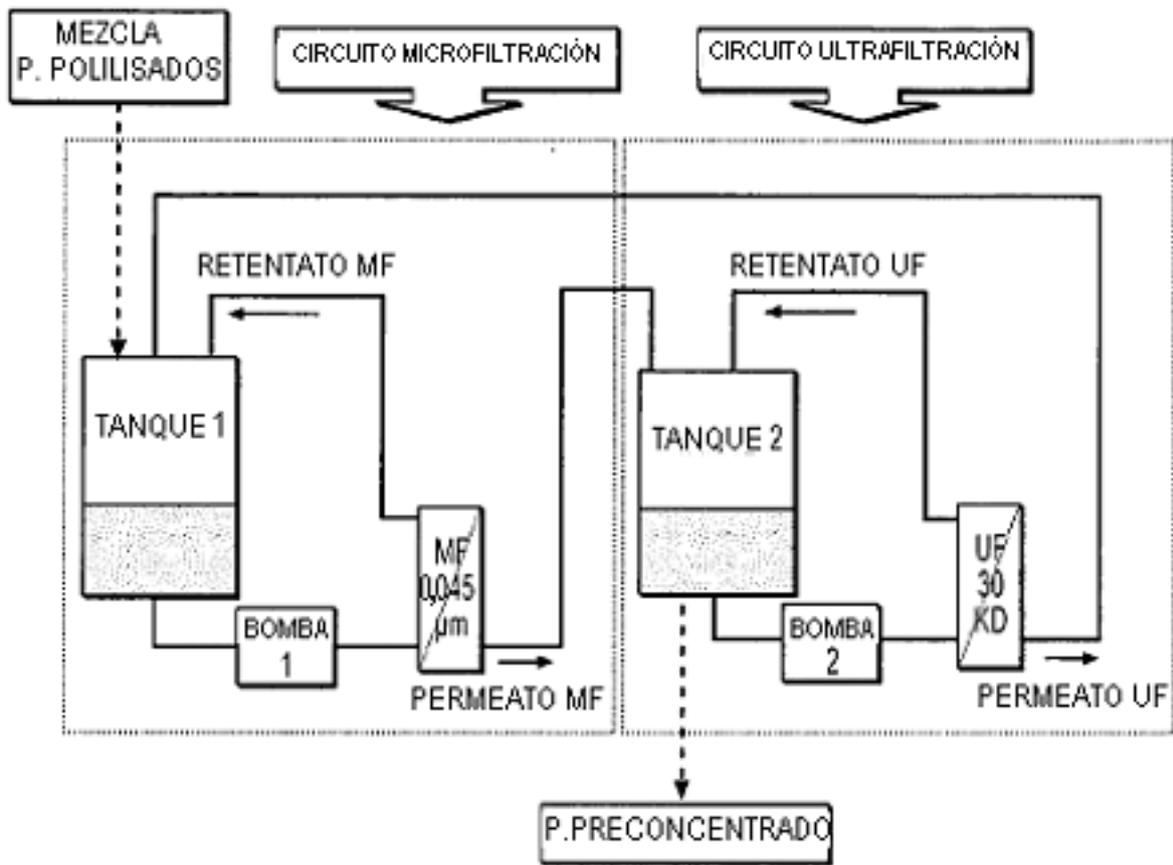


FIG. 1

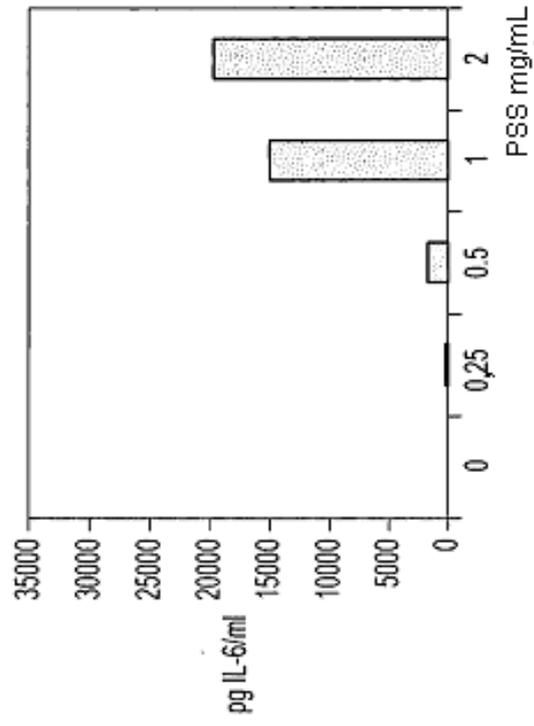


FIG. 2a

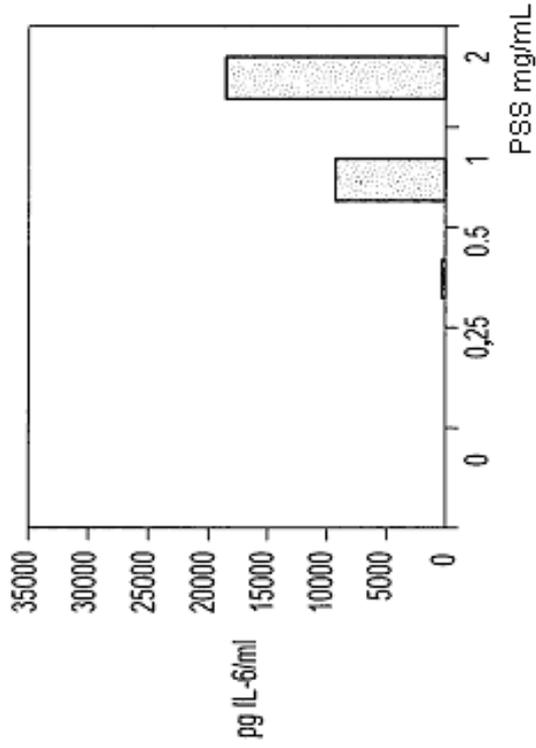


FIG. 2b

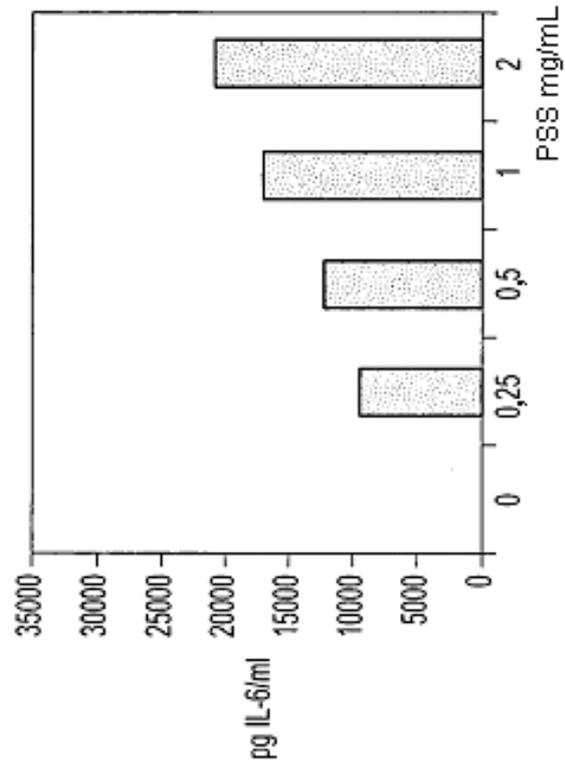


FIG. 3a

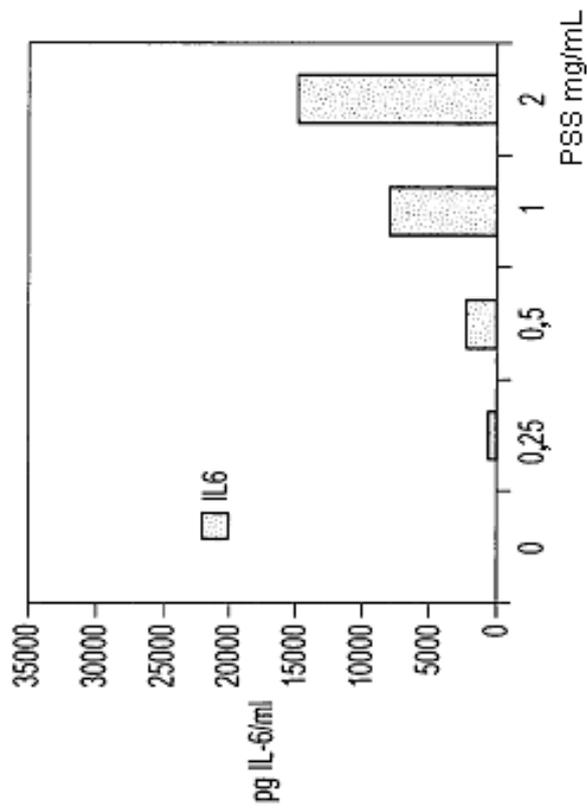


FIG. 3b

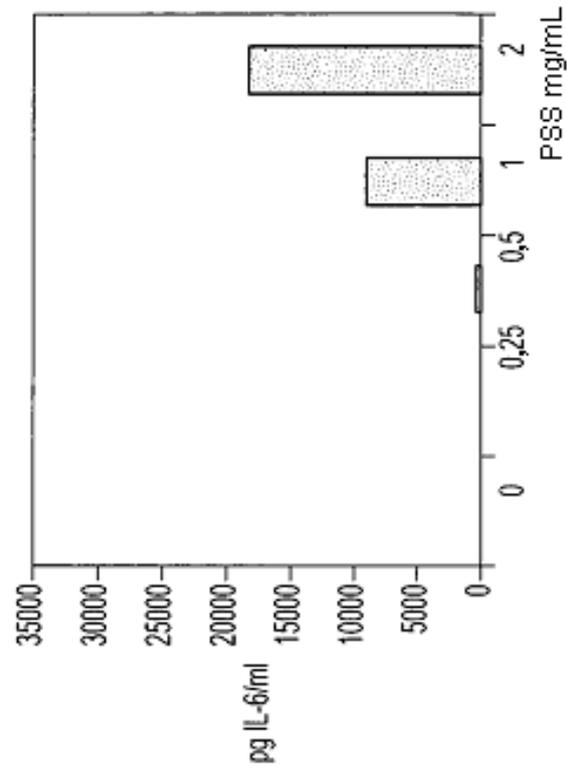


FIG. 4b

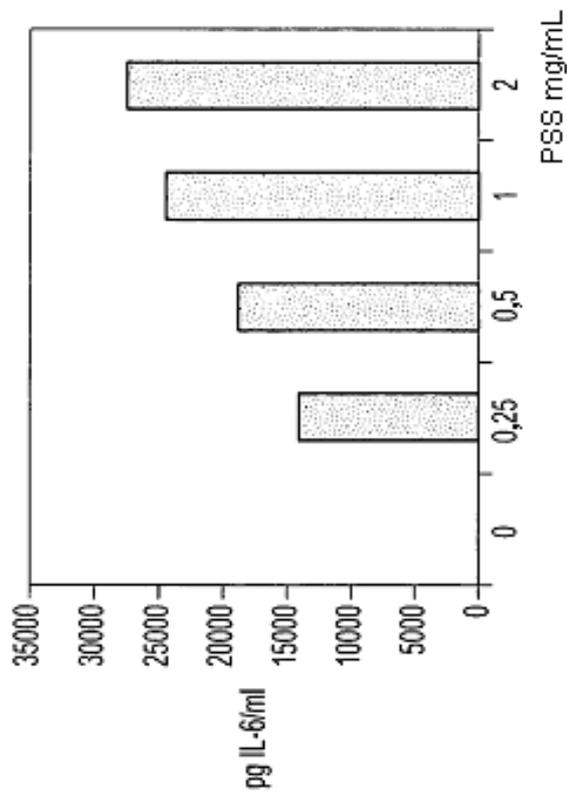


FIG. 4a

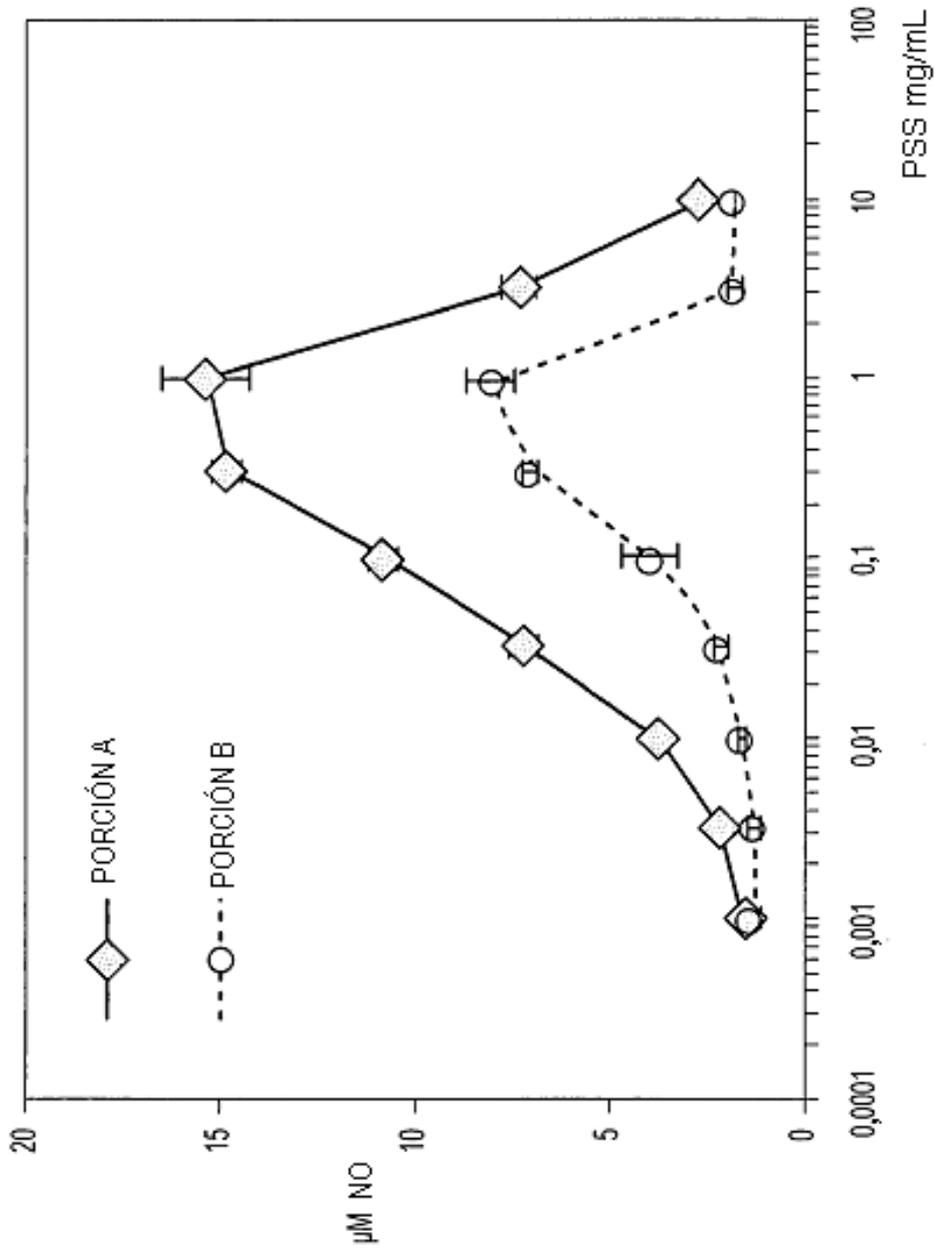


FIG. 5

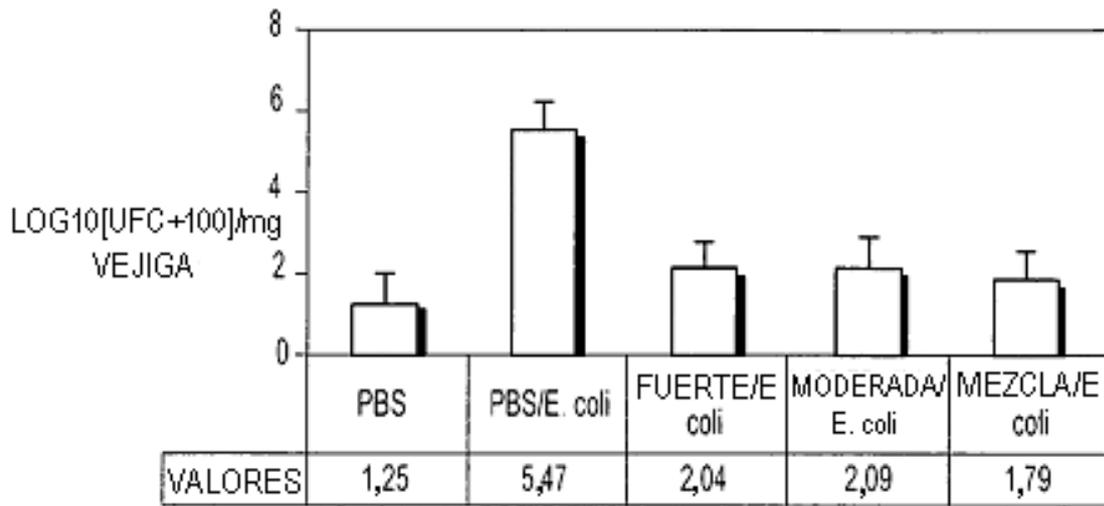


FIG. 6a

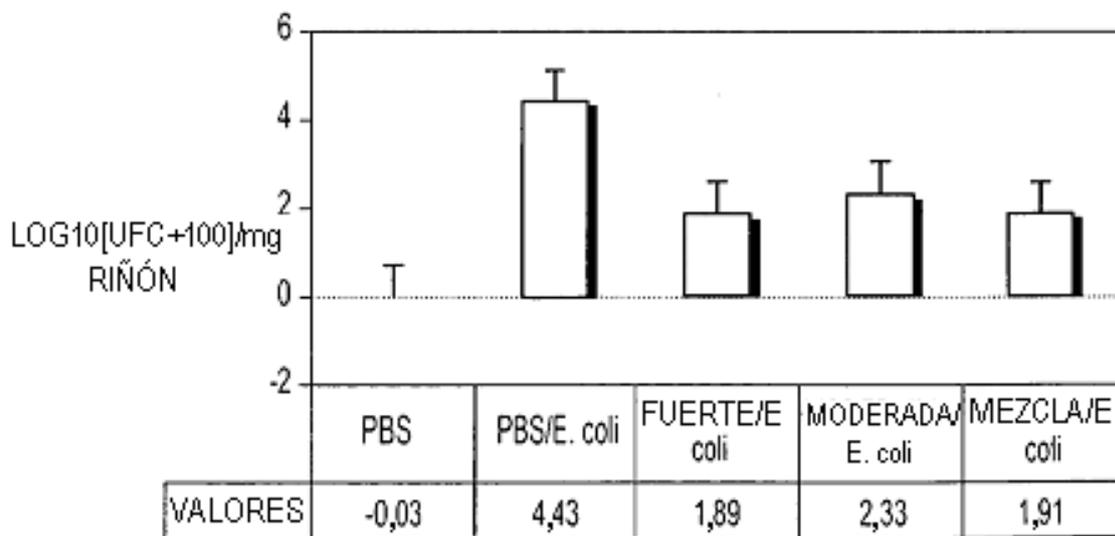
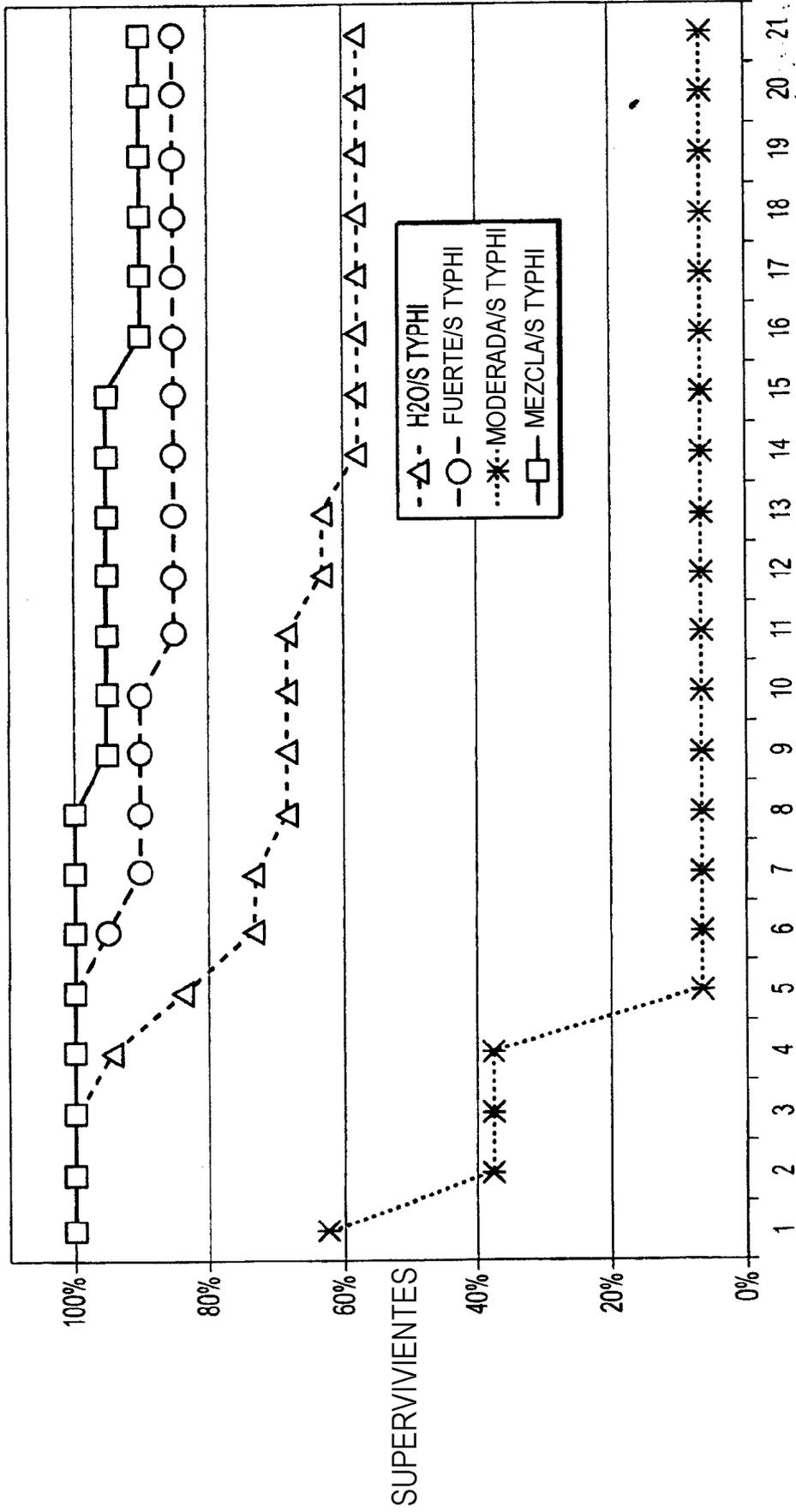


FIG. 6b



DÍAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN POR S TYPHI

FIG. 7