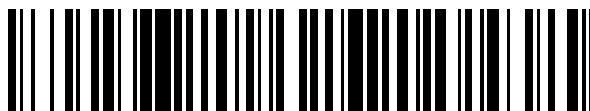


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 002**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 35/00</b>	(2006.01)
<b>A01N 63/02</b>	(2006.01)
<b>C12N 1/12</b>	(2006.01)
<b>C12N 1/20</b>	(2006.01)
<b>C12P 1/00</b>	(2006.01)
<b>C12P 1/04</b>	(2006.01)
<b>C12P 39/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2008 PCT/US2008/055906**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2008 WO08109669**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2008 E 08731433 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2114421**

54 Título: **Extracto bacteriano para trastornos respiratorios y procedimiento para su preparación**

30 Prioridad:

**05.03.2007 US 904789 P**

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

**24.04.2018**

73 Titular/es:

**OM PHARMA  
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 2 665 002 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 respiratorios y procedimiento para su preparación

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a extractos de cepas bacterianas útiles como tratamiento para indicaciones tales como trastornos respiratorios, a composiciones que comprenden los extractos y a procedimientos para producir los extractos utilizando medios que no plantean un riesgo de enfermedades priónicas.

**Antecedentes y compendio de la invención**

10 La presente invención se refiere a composiciones que comprenden extractos bacterianos útiles para tratar estados de salud tales como trastornos respiratorios. Los extractos comprenden lisados bacterianos procedentes de cultivos seleccionados entre todas las especies siguientes:

15 *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, *Moraxella (Moraxella) catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus sanguinis*. Los extractos pueden comprender además lisados bacterianos procedentes de cultivos seleccionados entre las especies siguientes: *Staphylococcus Hemolyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius* (también conocida como *Streptococcus viridans*), *Neisseria sicca*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Actinobacillus (Hemophilus) actinomycetemcomitans* y *Eikenella corrodens*.

20 Según algunas realizaciones de la presente invención, las cepas de dichas especies bacterianas se seleccionan entre las siguientes cepas bacterianas: *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* 3622, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* 3625, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* I-045, *Haemophilus influenzae* 8467, *Klebsiella pneumoniae ssp. ozaenae* 5050, *Klebsiella pneumoniae* 204, *Klebsiella pneumoniae* 5056, *Staphylococcus aureus* I-049, *Staphylococcus aureus* I-050, *Staphylococcus aureus* I-051, *Staphylococcus aureus* I-052, *Staphylococcus aureus* I-053, *Staphylococcus aureus* I-054, *Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae* 7465, *Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae* 7466, *Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae* 7978, *Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae* 10319, *Streptococcus pyogenes* 8191, *Streptococcus sanguinis* I-046, *Streptococcus sanguinis* I-047, *Streptococcus sanguinis* I-048, *Staphylococcus Hemolyticus* 11042, *Enterococcus faecalis* 103015, *Streptococcus mutans* 10449, *Streptococcus anginosus* 10713, *Streptococcus mitis* 12261, *Streptococcus salivarius* 102503, *Neisseria sicca* 103345, *Haemophilus parainfluenzae* 7857, *Actinobacillus (Hemophilus) actinomycetemcomitans* 52.105 y *Eikenella corrodens* 10596. Estas cepas están depositadas según el Tratado de Budapest. Las cepas indicadas en la lista con número I fueron catalogadas por la Collection Nationale de Culture des Microorganismes en el Instituto Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75724 París, Francia. Todas las demás cepas fueron catalogadas por la National Collection of Type Cultures en Londres.

Además, para ayudar a la digestión, también puede utilizarse una cepa *Lactobacillus* u otra cepa de bacterias.

35 Los extractos pueden obtenerse mediante un procedimiento de lisis alcalina una vez cultivadas las células hasta una densidad óptica adecuada en un medio de cultivo. En algunas realizaciones, las bacterias se cultivan en cada caso en un medio que no plantea un riesgo de enfermedades relacionadas con priones ni un riesgo de otras enfermedades que puedan transmitirse a través de productos ingeridos obtenidos de medios de origen animal. Por ejemplo, en algunas realizaciones se utiliza un medio de origen vegetal para cultivar las células, tal como un medio basado en soja. En otras realizaciones se utiliza un medio sintético para cultivar células. En otras realizaciones más, un medio puede incluir extractos biológicos tales como extracto de levadura y suero de caballo, que tampoco plantea tales riesgos de enfermedad.

45 Los lisados pueden también filtrarse para eliminar ácidos nucleicos y restos celulares de mayor tamaño. Como consecuencia de la filtración, en algunas realizaciones la cantidad de ácido nucleico presente en los extractos es de menos de 100 µg/ml. En algunas realizaciones, los compuestos insolubilizados tales como los restos de pared celular y los lipopolisacáridos (LPS) insuficientemente degradados se eliminan también 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.

50 Los componentes de sacáridos pueden conservarse en los extractos, incluyendo los componentes de lipopolisacáridos (LPS). Durante el proceso de lisis, los sacáridos pueden ser modificados químicamente, por ejemplo segmentados en estructuras más pequeñas o sustituidos con otros grupos funcionales.

55 La racemización de aminoácidos durante el proceso de lisis crea también D-aminoácidos a partir de los L-aminoácidos de origen natural que se hallan en las proteínas naturales. Los D-aminoácidos pueden ser beneficiosos en cuanto a aumentar la biodisponibilidad de los extractos, dado que las proteínas constituidas principalmente o parcialmente por D-aminoácidos no se digieren eficazmente en el intestino de los mamíferos. Así, las moléculas antigénicas de los extractos que se modifican químicamente durante la lisis para que contengan D-aminoácidos permanecen en el cuerpo del paciente durante más tiempo, permitiendo potencialmente una acción

inmunoestimulante más intensa.

Aunque en la técnica anterior se han utilizado extractos bacterianos para estimular el sistema inmunitario contra enfermedades respiratorias, ha existido la necesidad de normalizar y controlar mejor esos extractos para hacerlos más seguros, más eficaces y más duraderos. Por ejemplo, antes se pensaba que los componentes de sacáridos, incluyendo los componentes de lipopolisacáridos (LPS) potencialmente tóxicos, debían eliminarse de los extractos bacterianos por razones de seguridad (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. nº 5,424,287). Sin embargo, la presente invención proporciona un procedimiento que tiene como resultado suficientes modificaciones químicas de los componentes de LPS para que puedan conservarse con seguridad los sacáridos. Conservar esos componentes puede mejorar la eficacia y proporcionar a los extractos antígenos adicionales.

Por ejemplo, los inventores han descubierto que un ajuste del pH y del tiempo de lisis puede permitir una degradación suficiente de componentes de pared celular potencialmente alergénicos o tóxicos. A diferencia de esto, las anteriores condiciones de lisis, con valores pH menores o tiempos más cortos, producían extractos en los que los componentes de pared celular y los sacáridos no estaban suficientemente modificados químicamente (véase por ejemplo el documento GB 2 021 415 A). Los extractos resultantes eran demasiado alergénicos para administrarlos con seguridad a los pacientes. En general, los inventores han descubierto que los productos lisados con un pH demasiado bajo y/o en un tiempo demasiado corto tenían una mayor toxicidad, una menor extracción de proteínas y una menor filtrabilidad.

El proceso de filtración puede influir también en las propiedades del extracto resultante, dado que el tamaño de poro del filtro y, en algunos casos, las propiedades químicas de la superficie del filtro pueden cambiar el tipo de materiales eliminados y retenidos. Por ejemplo, algunas realizaciones de la presente invención utilizan un procedimiento de filtración diseñado para retener sacáridos, pero para eliminar otros componentes moleculares tales como ácidos nucleicos.

Así, la presente invención proporciona parámetros que normalizan los extractos bacterianos para ayudar a mantener una seguridad y una eficacia uniformes.

#### **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1: Un diagrama de un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF, por sus siglas en inglés) para la preparación de extractos bacterianos después de una lisis de bacterias. El diagrama muestra dos configuraciones diferentes para filtros: un modo paralelo en el que todos los filtros trabajan simultáneamente y un modo de serpenteo en el que los filtros están configurados en serie.

Figura 2: Producción de IL-6 y TNF- $\alpha$  por PBMC (células mononucleares de sangre periférica) humanas incubadas con diluciones en serie de una mezcla purificada de extractos de los Ejemplos 2.2, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 y 3.10.

Figura 3: Supervivencia de ratones provocados con virus H1N1 durante 3 semanas después de la infección. Mc Nemar: ensayo \* $p=0,023$  para 10 mg tratamiento versus control.

Figura 4: Efectos de la concentración de NaOH, de la cantidad de biomasa (expresada en gramos de peso en seco por milímetro) y de la duración de la lisis (en horas) en las actividades biológicas de extractos de HAIN 8467 purificados (Ejemplos 2.1, 2.5, 2.8) en un bioensayo de óxido nítrico en macrófagos múridos.

Figura 5: Bioensayo de óxido nítrico en macrófagos múridos de una mezcla purificada de extractos de *Diplococcus pneumonia* (Ejemplo 3.6).

Figura 6: Actividades biológicas de los extractos del Ejemplo 3.1 y del Ejemplo 3.3 (etiquetados 3a y 3c, respectivamente) en un bioensayo de óxido nítrico en macrófagos múridos.

Figura 7: Actividades biológicas de una mezcla purificada de extractos de los Ejemplos 2.2, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 y 3.10 en un bioensayo de óxido nítrico en macrófagos múridos.

Figura 8: Efectos de un extracto según la invención en la secreción de histamina de mastocitos de rata estimulados con el compuesto 48/80.

Figura 9: Valores medios totales de unidades formadoras de colonias (UFC) en tejidos (a) de vejiga y (b) de riñón para diferentes grupos experimentales.

Figura 10: Efecto de una realización de la invención en un modelo de infección con *Escherichia coli* en una cepa de ratones no sensible a los LPS. La figura muestra datos de citometría de flujo con (a) marcadores CD14 versus FoxP3 y (b) TCR versus FoxP3. Los recuadros de la izquierda muestran tejido no tratado, mientras que los recuadros de la derecha muestran tejido tratado.

**Descripción detallada de la invención**

## Definiciones

5 Extracto: Un extracto, tal como se define en la presente memoria, significa un material obtenido después de una lisis de cepas bacterianas. En algunos casos, el extracto se obtiene de sólo una cepa, mientras que en otros el extracto se obtiene de una mezcla de varias cepas diferentes.

Lisis alcalina: Éste es un método de lisar células bacterianas en condiciones básicas.

Lisado: Tal como se utiliza en la presente memoria, este término significa un extracto de bacterias obtenido de un proceso de lisis celular.

10 Filtración: Un proceso de filtración, tal como se describe en la presente memoria, significa un paso de un extracto o de una mezcla de extractos a través de uno o más filtros tales como microfiltros (es decir microfiltración) o ultrafiltros (es decir ultrafiltración). Tal filtración puede no eliminar necesariamente el 100 % de los componentes que está diseñada para eliminar. En algunos casos, la filtración se repite en varias pasadas o ciclos.

pH inicial: Este término significa el pH medido al principio de un proceso, tal como una lisis bacteriana o una filtración.

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

20 D-aminoácidos: Este término se refiere a aminoácidos que existen en formas isoméricas dextrógiras, a diferencia de los L-aminoácidos producidos por biosíntesis, que existen en formas isoméricas levógiras.

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

25 Un medio que evita el riesgo de enfermedades de origen priónico significa un medio de cultivo utilizado en cualquier etapa de la preparación de los extractos que no comprende materiales tales como extractos de carne o suero obtenidos de animales tales como vacas u ovejas, o de cualquier otro animal que pueda transmitir enfermedades de origen priónico. Los ejemplos de tales medios incluyen medios de origen vegetal o sintéticos y también medios que utilizan suero de caballo o medios que comprenden materiales obtenidos de especies animales que no transmiten enfermedades priónicas. Los ejemplos de enfermedades de origen priónico incluyen, por ejemplo, la enfermedad de las vacas locas, la tembladera (*scrapie*) y la enfermedad de Creutzfeld-Jacob.

30 Un medio no animal es un medio que no incluye componentes obtenidos de animales. Los ejemplos incluyen un medio de origen vegetal, tal como un medio de soja, y un medio sintético.

Tratamiento, tal como se utiliza en la presente memoria, significa tanto tratamiento de infecciones actuales, por ejemplo, como prevención del desarrollo de nuevas infecciones o protección contra el mismo, por ejemplo.

35 Individuo, tal como se utiliza en la presente memoria, significa cualquier individuo animal, incluyendo individuos mamíferos, tales como humanos y mamíferos domésticos.

40 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 la presente memoria o un clon genético de la misma, incluyendo una cepa que haya sido redepositada en un momento posterior con una denominación codificada de depósito diferente, pero que se considere que genéticamente es la misma cepa que la versión originalmente depositada.

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

## Preparación de extractos

45 Los extractos bacterianos de la presente invención pueden prepararse mediante fermentación, seguida de una inactivación térmica y una lisis alcalina y filtración. Para cada cepa, con el fin de obtener una cantidad suficiente de material, los cultivos de fermentación pueden iniciarse a partir de un lote de siembra de trabajo, seguido de una inoculación en recipientes de fermentación de mayor tamaño.

50 Los medios utilizados pueden ser los mismos para cada especie. Sin embargo, pueden introducirse factores de crecimiento suplementarios para mejorar el crecimiento de algunas especies. En algunas realizaciones puede utilizarse un medio que evite el riesgo de enfermedades de origen priónico para cultivar al menos algunas de las cepas, o todas ellas. Los ejemplos incluyen medios no animales tales como un medio de origen vegetal y medios

5 sintéticos. Otros ejemplos incluyen un medio que incluya suero de caballo u otro extracto animal, obtenido de una especie de animal que no suponga una amenaza de enfermedades priónicas, a diferencias de las cepas cultivadas en presencia de suero bovino o extractos de carne, que pueden plantear tales riesgos. En algunas realizaciones puede añadirse al medio un dipéptido Ala-Gln. Los inventores observaron que el dipéptido Ala-Gln, en algunas realizaciones, servía de estimulador del crecimiento para el cultivo bacteriano.

10 Tras la fermentación, la biomasa resultante de cada cepa o de un conjunto de cepas puede inactivarse mediante un tratamiento térmico, concentrarse y congelarse. El material celular puede lisarse con iones hidróxido, tales como los del NaOH. En algunas realizaciones puede lisarse una concentración de biomasa de 2 a 130 g/l de peso en seco bacteriano, tal como de 20 a 120 g/l, o de 5 a 90 g/l, o de 10 a 50 g/l, o de 40 a 90 g/l. (La concentración de biomasa se proporciona en la presente memoria como el peso en seco bacteriano por litro de lisis. La concentración de biomasa se mide secando 5 ml de material en una pequeña placa de porcelana a 105 °C hasta que alcanza una masa constante y registrando a continuación la masa en gramos por litro). Por ejemplo, las cepas de *Haemophilus* pueden lisarse en una concentración de biomasa de 15-90 g/l, tal como de 40 a 90 g/l, tal como 40, 50, 60, 70, 80 o 90 g/l o intervalos menores limitados por dichas concentraciones (es decir 40-50, 70-90, etc.). Las cepas de *Streptococcus*, por ejemplo, pueden lisarse en una concentración de 10 a 90 g/l, tal como 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 g/l o intervalos menores limitados por dichas concentraciones. Las cepas de *Moraxella* pueden lisarse en concentraciones, por ejemplo, de 5 a 60 g/l, o de 10-60 g/l, o de 15-40 g/l, tal como 5, 10, 20, 30, 40, 50 o 60 g/l o intervalos menores limitados por dichas concentraciones. Las cepas de *Klebsiella* pueden lisarse en concentraciones, por ejemplo, de 10 a 50 g/l, tales como 25-50 g/l, o 10, 20, 30, 40 o 50 g/l o intervalos menores limitados por dichas concentraciones. Las cepas de *Staphylococcus* pueden lisarse en concentraciones, por ejemplo, de 30 a 90 g/l, tales como 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 g/l o intervalos menores limitados por dichas concentraciones. Las cepas de *Neisseria* pueden lisarse en concentraciones, por ejemplo, de 5 a 60 g/l, tales como 5, 10, 20, 30, 40, 50 o 60 g/l o intervalos menores limitados por dichas concentraciones.

25 En algunas realizaciones puede utilizarse para la lisis una concentración de hidróxido de 0,01 N a 1,2 N, tal como de 0,1 a 1 N, o de 0,05 N a 0,4 N, tal como 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35 o 0,4 N, o intervalos menores limitados por dichas concentraciones, o de 0,5 N a 1,0 N, tal como 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 N, o intervalos menores limitados por dichas concentraciones. Puede utilizarse una concentración de base de manera que se alcance un pH inicial de 12 o más, un pH mayor de 12, un pH mayor de 12,5, o un pH tal como de un pH 12,0 a un pH 13,4, o un pH de 12,6 a 13,4. Por ejemplo, para las cepas de *Streptococcus*, la concentración de hidróxido puede ser de 0,1-0,7 N o de 0,2-0,5 N, tal como 0,2, 0,3, 0,4 o 0,5 N o intervalos menores limitados por dichas concentraciones. Para las cepas de *Moraxella* o *Haemophilus* puede ser de 0,05 - 0,7 N o de 0,15-0,5 N, tal como 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45 o 0,5 N o intervalos menores limitados por dichas concentraciones. Para las cepas de *Klebsiella* o *Staphylococcus* puede ser de 0,1-0,7 N, o de 0,15-0,4 N, tal como 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35 o 0,4 N o intervalos menores limitados por dichas concentraciones.

35 La temperatura de lisis puede ser de 30 a 60 °C, tal como de 30-40 °C, o de 35-40 °C, tal como de 37 °C. El tiempo de lisis puede ser desde 20 horas o desde 40 horas hasta varios días, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o incluso 15 días. Por ejemplo, para las cepas de *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Moraxella* y *Staphylococcus* puede emplearse un tiempo de 5-9 días, y un tiempo de 7-10 días para las cepas de *Klebsiella* y *Neisseria*. En algunas realizaciones pueden emplearse temperaturas de lisis de 30-40 °C, o de 35-40 °C, tal como 37 °C, para cada una de las cepas y la lisis puede producirse durante un periodo de 72 a 210 horas (3-9 días), tal como 3 días, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 días o intervalos de horas o días limitados por dichos tiempos (por ejemplo 3-4 días, 8-9 días, etc.). Se entiende que estos intervalos de tiempo incluyen cualquier número fraccionario de días, horas o minutos.

En algunas realizaciones, cuando se utiliza más de una cepa del mismo género bacteriano, las cepas pueden lisarse juntas o por separado. Las cepas pueden mezclarse antes o después de la lisis.

45 Los extractos pueden purificarse mediante centrifugación y/o filtración. Por ejemplo, los lisados pueden centrifugarse a 9.000 x gravedad y someterse a continuación a una o varias rondas de filtración en un filtro de 0,2 micras. En algunos casos pueden utilizarse rondas sucesivas de filtración en filtros de poros grandes y a continuación una filtración en un filtro de 0,2 micras. También pueden emplearse métodos de ultrafiltración con el fin de ayudar a extraer los materiales solubles del extracto, por ejemplo, recirculando el permeado de ultrafiltración para una posterior microfiltración.

50 En algunas realizaciones puede utilizarse un método de filtración de flujo tangencial (TFF) para filtrar los extractos y para extraer moléculas solubilizadas de restos celulares de mayor tamaño (véase la Figura 1) (véase, por ejemplo, Separations Technology, Pharmaceutical and Biotechnology Applications, Wayne P. Olson, Editor. Interpharm Press, Inc., Buffalo Grove, IL, EE.UU., p.126 a 135 - ISBN:0-935184-72-4). Al principio de tal proceso puede almacenarse en un primer tanque un lisado bacteriano diluido. Se inicia un circuito de microfiltración (MF) y se bombea el producto. El retenido de MF resultante se recicla, mientras que el permeado de MF se transfiere a un segundo tanque.

60 Una vez alcanzado un grado adecuado de concentración puede iniciarse un circuito de ultrafiltración (UF). El permeado de UF puede recircularse de vuelta al primer tanque para una extracción continua de compuestos solubilizados del lisado, mientras que el retenido de UF se almacena en el segundo tanque. Durante la extracción

continua, los volúmenes de los tanques 1 y 2 pueden ajustarse mediante una regulación de los caudales de los permeatos de microfiltración y ultrafiltración.

Pueden llevarse a cabo varios ciclos de extracción de este tipo, bien con TFF, bien con otro método de filtración. En realizaciones que utilizan TFF, al final del último ciclo se puede parar el circuito de ultrafiltración y se puede hacer funcionar solo el circuito de microfiltración y transferir el permeado MF al tanque 2.

El circuito de microfiltración puede equiparse con filtros de 1,2 micras a 0,1 micras, tales como filtros de 0,65 a 0,2 micras, o de 0,45 micras. El flujo transversal puede estar entre 1.000 litros/hora m<sup>2</sup> (LHM) y 3.000 LHM, tal como entre 1.500 y 2.500 LHM, o ser de 2.000 LHM, con una presión transmembrana (PTM) de 0,6 a 2 bares, tal como entre 0,8 y 1,5 bares, o de 1,0 bar. El circuito de ultrafiltración puede equiparse 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 transversal 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 de 0,5 bares.

Para extraer compuestos solubilizados de las paredes celulares bacterianas pueden utilizarse entre 5 y 20 volúmenes de diafiltración. En algunas realizaciones se utilizan entre 8 y 15 volúmenes. Por lo tanto, por ejemplo, en algunas realizaciones pueden utilizarse 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.

A continuación de la filtración, los extractos pueden posteriormente diluirse, concentrarse o centrifugarse, si se desea. También pueden incluirse etapas de purificación para eliminar materia particulada de los extractos. Por ejemplo, puede llevarse a cabo una microfiltración posterior utilizando un filtro de poros más pequeños, tal como un filtro de 0,2 micras. Tras la filtración, la producción de proteínas solubilizadas medida mediante Lowry puede ser de más de un 50 % o puede ser de más de un 60 % o puede ser de un 50 a un 90 %, o puede ser de un 60-90 %, por ejemplo. Después de la filtración, el extracto puede liofilizarse antes de formularlo para su uso.

En algunas realizaciones de la invención puede elegirse un grupo de condiciones de lisis y aplicarse el mismo a una o más cepas bacterianas. De 40 a 90 g/l, o 40, 50, 60, 70, 80 o 90 g/l de *Haemophilus influenzae* NCTC 8467 pueden lisarse durante 72-200 horas, tal como 72, 96, 120, 150 o 200 horas. De 10 a 95 g/l de una o más cepas de *Streptococcus*, tal como 10, 20, 40, 60, 80, 90 o 95 g/l, pueden lisarse durante 72-210 horas, tal como 72, 96, 120, 150 o 200 horas. De 15 a 80 g/l de una o más cepas de *Diplococcus*, tal como 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 u 80 g/l, pueden lisarse durante 72-210 horas, tal como 72, 96, 120, 150 o 200 horas. De 10 a 50 g/l de una o más cepas de *Klebsiella*, tal como 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 g/l, pueden lisarse durante 72-210 horas, tal como 72, 96, 120, 150 o 200 horas. De 5 a 60 g/l de una o más cepas de *Neisseria*, tal como 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 g/l, pueden lisarse durante 72-210 horas, tal como 72, 96, 120, 150 o 200 horas. De 30 a 90 g/l de una o más cepas de *Staphylococcus*, tal como 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 g/l, pueden lisarse durante 72-210 horas, tal como 72, 96, 120, 150, 200 horas. En cada una de esas realizaciones, la lisis puede llevarse a cabo a 35-40 °C, tal como a 37 °C. Además, pueden utilizarse condiciones de lisis o bien "moderadas", o bien "duras", para cada cepa que forme el extracto o un grupo de cepas similares. Tal como se utiliza en la presente memoria, condiciones de lisis "moderadas" se refiere a una concentración de ion hidróxido de 0,05 a 0,4 N, tal como 0,1, 0,2, 0,3 o 0,4 N, junto con los parámetros de biomasa, tiempo y temperatura que se acaban de indicar para cada tipo de cepa (por ejemplo 35-40 °C, 40-90 g/l de biomasa y 72-200 horas para *Haemophilus influenzae* NCTC 8467). Tal como se utiliza en la presente memoria, condiciones de lisis "duras" se refieren a una concentración de ion hidróxido de 0,5 a 1 N, tal como 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 y 1 N, junto con los parámetros de tiempo, temperatura y biomasa para cada cepa que se acaban de indicar. En algunas realizaciones pueden llevarse a cabo lisis tanto duras como moderadas, con los productos resultantes mezclados entre sí.

En algunas realizaciones de la invención, el extracto puede obtenerse de más de una cepa bacteriana, tal como de al menos una cepa gramnegativa y al menos una cepa grampositiva. Pueden mezclarse cepas bacterianas de la misma especie o de especies diferentes antes o después de la lisis. En algunas realizaciones pueden mezclarse cepas, por ejemplo, para obtener un 1-40 % en volumen de cada una en la mezcla o un 15-30 % en volumen de cada género de bacterias. En algunas realizaciones, el extracto puede comprender productos de lisis de, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 10 géneros diferentes de bacterias. Por ejemplo, una mezcla de 5 géneros puede comprender cepas de *Haemophilus*, *Moraxella*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, incluyendo *Streptococcus sanguinis*, *pyogenes* y *pneumoniae*. Algunas cepas de *Streptococcus pneumoniae* se conocen también, por ejemplo, como cepas de *Diplococcus*. En algunas de tales realizaciones con 5 géneros, la mezcla puede contener de un 5 a un 15 % de *Haemophilus* en volumen, tal como un 7-10 %, o un 7, 8 o 9 %; de un 5 a un 15 % de *Diplococcus* en volumen, tal como un 7-10 % o un 7, 8 o 9 %; un 5-20 % de *Streptococcus* en volumen, tal como un 7-15 %, o un 8, 9, 10, 11 o 12 %; de un 10 a un 30 % de *Klebsiella* en volumen, tal como un 15-25 %, o un 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 %; de un 10 a un 30 % de *Staphylococcus* en volumen, tal como un 15-25 %, o un 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 %; y de un 20 a un 40 % de *Neisseria* en volumen, tal como un 25-35 %, o un 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 o 34 %.

Propiedades químicas de extractos bacterianos

Algunas realizaciones según 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, o 5-10 mg/ml, o 6-8 mg/ml de proteínas o un intervalo que

empiece o termine a partir de 5, 6, 8, 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 (AA) libres, o de 1,5 a 2 mg/ml, o de 2 a 2,5 mg/ml de AA libres, o un intervalo que empiece o termine a partir de 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 AA libres, calculados 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 empiece o termine a partir de 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, tal como, por ejemplo, de 0,4 a 0,5 mg/ml. Por ejemplo, algunas realizaciones contienen aproximadamente de 6 a 8 mg/ml de proteínas, de 1,5 a 2,5 mg/ml de aminoácidos (AA) libres, calculados a partir del ácido glutámico (147,1 g/mol) y/o aproximadamente de 0,4 a 0,5 mg/ml de polisacáridos y monosacáridos. La concentración de proteínas se mide mediante el ensayo de Lowry según el método 2 de la Farmacopea Europea 2.5.33. La concentración de azúcar se ensaya tras una hidrólisis ácida y una derivatización según D. Herbert et al., *Meth. Microbiol.* 5B: 266 y siguientes (1971). La concentración de glutamato (ácido glutámico) se mide convirtiendo aminoácidos en derivados de isoindol y midiendo la absorbancia a 340 nm, según Roth M., Fluorescence reaction for amino acids, *Anal. Chem.*, 43, 880-882 (1971).

En algunas realizaciones, la concentración de equivalentes de LPS sobre la base de un ensayo cromógeno de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) es de menos de 1.000 ng/ml, o menos de 500 ng/ml, menos de 200 ng/ml, o menos de 100 ng/ml.

La lisis de bacterias según la presente invención puede tener como resultado una hidrólisis parcial de proteínas, así como una desaminación, una desamidación y una racemización parcial de aminoácidos de L a D. En un estudio analítico de un extracto según la invención se observaron en cada caso picos que representaban ácido D-aspartico, ácido D-glutámico, D-serina, D-metionina, D-histidina, D-alanina, D-arginina, D-fenilalanina, D-tirosina, D-leucina y D-lisina. El porcentaje de D-aminoácidos de esas especies en este estudio oscilaba entre un 3 % y un 40 %. Por lo tanto, algunas realizaciones de la invención permiten la racemización de uno o más de los siguientes: serina, treonina, histidina, alanina, arginina, tirosina, fenilalanina, leucina y lisina, tal como todos los aminoácidos anteriores, o cualquier selección de más de uno pero menos de la totalidad de los aminoácidos anteriores, tal como, por ejemplo, alanina, fenilalanina y lisina. En algunas realizaciones, al menos un 10 % de uno o más de los aminoácidos anteriores puede racemizarse de D a L. En otras realizaciones, al menos un 40 % de uno o más de los aminoácidos anteriores puede racemizarse.

La lisis de bacterias según la presente invención puede tener como resultado una disminución del peso molecular de moléculas componentes de 0 a 300 kDa a 0 a 100 kDa, o 0 a 60 kDa, debido a la hidrólisis.

#### Actividades biológicas de extractos bacterianos

Los extractos según la invención pueden ser eficaces para tratar a pacientes que padezcan o presenten riesgo de desarrollar estados de salud tales como trastornos respiratorios y reacciones alérgicas o estados alérgicos. Los extractos según la invención pueden ser eficaces para tratar, por ejemplo, infecciones de las vías respiratorias superiores e inferiores, dermatitis atópica, nasofaringitis, sinusitis, faringitis, amigdalitis, laringitis, traqueítis, laringofaringitis, gripe, neumonía, bronconeumonía, bronquitis, infecciones de las vías respiratorias inferiores, rinitis alérgica, asma alérgica, rinitis, nasofaringitis, faringitis, sinusitis, amigdalitis, laringitis, laringotraqueítis, bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva con infección aguda de las vías respiratorias inferiores, y enfermedad pulmonar obstructiva con exacerbación aguda.

La actividad biológica de los extractos puede determinarse mediante varios ensayos. Por ejemplo, un ensayo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) prueba la producción de la citocina IL-6 de las PBMC y puede rastrear la capacidad de un extracto para estimular el sistema inmunitario. Por ejemplo, en algunas realizaciones la concentración de IL-6 *in vitro* medida en sobrenadantes de PBMC estimuladas con los extractos de la invención oscilaba entre 2.000 pg/ml y 70.000 pg/ml, entre 2.000 pg/ml y 50.000 pg/ml, entre 2.000 pg/ml y 30.000 pg/ml, entre 2.000 pg/ml y 20.000 pg/ml, entre 2.000 pg/ml y 10.000 pg/ml o entre 5.000 pg/ml y 70.000 pg/ml, entre 5.000 pg/ml y 50.000 pg/ml, entre 5.000 pg/ml y 30.000 pg/ml, entre 5.000 pg/ml y 25.000 pg/ml o entre 5.000 pg/ml y 10.000 pg/ml, o entre 15.000 pg/ml y 25.000 pg/ml. Cuando se utilizó LPS como control de agonista (a 0,01 µg/ml), los valores obtenidos oscilaban, dependiendo de los donantes, entre 5.000 pg/ml y 70.000 pg/ml.

Un ensayo de óxido nítrico (NO) en múridos mide la producción de NO por macrófagos múridos, que también indica la estimulación inmunitaria. Por ejemplo, los macrófagos producen NO para matar bacterias invasoras. En algunas realizaciones, la actividad de óxido nítrico (NO) para realizaciones de la presente invención ensayadas en concentraciones que oscilaban entre 0,001 mg/ml y 10 mg/ml de peso en seco soluble proporcionó respuestas máximas que oscilaban entre óxido nítrico 3 µM y 100 µM, o entre 3 µM y 90 µM, entre 3 µM y 80 µM, entre 3 µM y 70 µM, entre 3 µM y 60 µM, entre 3 µM y 50 µM, entre 3 µM y 40 µM, entre 3 µM y 30 µM, entre 3 µM y 20 µM, entre 3 µM y 10 µM, o entre 5 µM y 80 µM, entre 5 µM y 60 µM, entre 5 µM y 40 µM, entre 5 µM y 20 µM, o entre 10 µM y 80 µM, entre 10 µM y 70 µM, entre 10 µM y 50 µM, entre 10 y 30 µM, o entre 10 µM y 15 µM, o en intervalos que comienzan o terminan a partir de 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 humanas y macrófagos múridos *in vitro* pueden depender de variables tales como la cantidad de peso en seco de biomasa bacteriana que se haya de 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 utilizados en la lisis.

5 La combinación de ensayos de actividad *in vitro* tales como PBMC y NO con una determinación de la concentración de LPS, tal como mediante LAL, puede proporcionar también información relativa al equilibrio de actividad versus riesgo de toxicidad para un determinado extracto bacteriano.

10 Los extractos de esta invención pueden también ser activos contra la infección con virus de la gripe por aerosol, tal como contra A/PR/8/34 (H1N1). En un estudio, por ejemplo, un extracto según la presente invención fue capaz de conferir una inmunoprotección completa a ratones en una dosis de 10 mg/ratón, según se consideró en virtud de la mortalidad, titulación de virus pulmonares, síntomas clínicos y títulos de anticuerpo. En cambio, sólo un 70 % de los animales de control sobrevivió a la infección.

15 Como otro ejemplo, la tasa de supervivencia 13 días después de una provocación de al menos 8 ratones con sensibilidad a los LPS de tipo silvestre con *Salmonella thyphimurium* es de al menos un 60 % cuando dichos ratones son tratados en primer lugar durante 10 días con cantidades eficaces de algunas realizaciones de la presente invención. La dosis de *Salmonella thyphimurium* para la provocación puede elegirse de tal manera que los ratones no tratados o los ratones tratados con una formulación de agua o una formulación de control en blanco que contenga excipientes, pero no extracto, tengan una tasa de supervivencia del 60 % o menos, tal como del 50 % o menos. En algunos casos, la tasa de supervivencia para los ratones tratados con extracto es de al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 %.

20 Además, algunas realizaciones de esta invención pueden también inhibir la secreción de histamina por mastocitos estimulados con compuesto 48/80 en un grado estadísticamente significativo, como se mostrará posteriormente en detalle. Por ejemplo, algunas realizaciones de la invención pueden presentar, en un ensayo de mastocitos estimulados con compuesto 48/80, un valor CI-50 entre, por ejemplo, 0,0005 y 0,01 mg/ml, tal como entre 0,0005 y 0,005 mg/ml, o entre 0,001 y 0,01 mg/ml, o entre 0,002 y 0,008 mg/ml, o entre 0,004 y 0,006 mg/ml, por ejemplo.

Composiciones que comprenden los extractos bacterianos

25 La mezcla de extractos liofilizados puede formularse de varias maneras diferentes para su administración final. Por ejemplo, pueden prepararse comprimidos orales, cápsulas, píldoras, así como formulaciones líquidas o aerosoles. También pueden prepararse formulaciones para infusión o inyección. Algunas realizaciones de esta invención pueden formularse, por ejemplo, como formas de dosificación sólidas o formas de dosificación líquidas. Las formas de dosificación sólidas ejemplares pueden incluir, por ejemplo, un comprimido, por ejemplo un comprimido revestido, un comprimido masticable, un comprimido efervescente, un comprimido sublingual, granulados, polvo o una cápsula, que contenga el extracto y, opcionalmente, uno o más suplementos nutricionales y/o dietéticos. Las formas de dosificación sólidas pueden contener también diluyentes, cargas y/u otros excipientes. Pueden añadirse otros componentes de excipiente tales como conservantes, colorantes, aromatizantes y edulcorantes. También es posible preparar formulaciones en polvo o granuladas. Para la vía oral pueden utilizarse también formas de dosificación líquidas, como soluciones, jarabes, suspensiones o gotas.

### Ejemplos de trabajo

Ejemplo 1: Cultivos bacterianos

Ejemplo 1.1: Cultivo de *Haemophilus influenzae* NCTC 8467

Condiciones iniciales de cultivo

40 Se prepararon medios de cultivo disolviendo en agua purificada los siguientes componentes: cloruro de sodio: 3 g/l; monohidrogenofosfato de sodio: 2 g/l; acetato de sodio: 0,5 g/l; peptona de soja 40 g/l; glucosa: 6 g/l; inosina: 0,1 g/l; cloruro de calcio: 0,02 g/l; cloruro de potasio: 0,1 g/l; bicarbonato de sodio: 0,6 g/l; piruvato de sodio: 0,06 g/l; solución metálica (sulfato de cobre: 3 mg/l; cloruro de hierro: 830 mg/l; sulfato de cinc: 860 mg/l; ácido sulfúrico: 1,1 mg/l); 0,5 ml/l; hemina: 25 mg/l; NADH (trihidrato reducido de sal disódica de dinucleótido de β-nicotinamida y adenina) 25 mg/l. Después de la disolución se ajustó el pH a 7,2. Después de esterilizar los medios, se inocularon individualmente matraces de Erlenmeyer pequeños con el contenido de viales congelados (que contenían 1,5 ml de bacterias congeladas) y se incubaron los mismos a 37 °C durante 8 horas. A continuación se transfirieron alícuotas de este cultivo a matraces de Erlenmeyer de mayor tamaño que contenían 150 ml de medios de cultivo y se incubaron de nuevo en las mismas condiciones. Se llevó a cabo otra operación de fermentación con 1.000 ml de medios de cultivo en las mismas condiciones, pero con 50 mg/l de hemina y 50 mg/l de NADH añadidos antes de la inoculación (DO a 700 nm para el cultivo 1 de 10 ml después de 10 horas: 3,7, para el cultivo de 1.000 ml después de 11 horas: 13,5). A continuación se transfirió a prefermentadores la totalidad del contenido de los cultivos de 1.000 ml.



## Condiciones de cultivo en prefermentadores

Se prepararon medios de cultivo disolviendo en agua purificada los siguientes componentes: cloruro de sodio: 3 g/l; monohidrogenofosfato de sodio: 2 g/l; acetato de sodio: 0,5 g/l, peptona de soja 40 g/l; glucosa 6 g/l; inosina: 0,1 g/l; cloruro de calcio: 0,02 g/l; cloruro de potasio: 0,1 g/l; bicarbonato de sodio: 0,6 g/l; piruvato de sodio: 0,06 g/l; solución metálica: 0,5 ml/l; hemina: 1 mg/l; NADH: 10 mg/l, polipropilenglicol: 0,06 - 0,10 ml/l. La temperatura de incubación se reguló a 30 °C, bajo agitación y aireación. El pH no se reguló durante el cultivo. Después de 13 horas, se transfirieron 2 prefermentadores a un fermentador (DO a 700 nm cultivo 1 después de 6 horas: 1,53; cultivo 2 después de 8,5 horas: 1,90). Los cultivos de los prefermentadores se transfirieron en condiciones estériles a fermentadores.

## 10 Condiciones de cultivo en fermentadores

Se prepararon medios de cultivo disolviendo en agua purificada los siguientes componentes: cloruro de sodio: 3 g/l; monohidrogenofosfato de sodio: 2 g/l; acetato de sodio: 0,5 g/l, peptona de soja 40 g/l; inosina: 0,1 g/l; cloruro de calcio: 0,02 g/l; cloruro de potasio: 0,1 g/l; bicarbonato de sodio: 0,6 g/l; piruvato de sodio: 0,06 g/l; solución metálica: 0,5 ml/l; hemina: 1,5 mg/l; NADH: 15 mg/l; polipropilenglicol: 0,02 - 0,04 ml/l.

15 Tras una esterilización se añadieron al cultivo 15 g/l de glucosa. La temperatura de incubación se reguló a 35 °C, bajo agitación y aireación. El pH se reguló a 6,8 durante el cultivo. Después de 8 horas, los cultivos (DO a 700 nm, cultivo 1 después de 7,25 horas: 3,69; cultivo 2 después de 8,75 horas: 3,55) se inactivaron mediante un tratamiento térmico a una temperatura de 90 a 100 °C y se transfirieron a un tanque de cosecha. Una vez inactivados, los cultivos se transfirieron a una centrífuga con el fin de separar la biomasa del medio de cultivo y concentrar. La biomasa cosechada se almacenó en un tanque conectado a una centrífuga. El retenido de la centrífuga (1.000 l/h) se recicló a un tanque de almacenamiento, mientras que el permeado se evacuó. La biomasa se concentró y a continuación se cosechó en un tanque esterilizado. Después de 3,25 horas se cosecharon 31.768 g de biomasa. La DO de la biomasa concentrada era de 237,4 a 700 nm. La biomasa se dividió en una serie de alícuotas que contenían 425 g de peso en seco de biomasa. A continuación se congelaron las alícuotas a -15 °C.

25 Ejemplo 1.2: Cultivos de *Staphylococcus*

## Condiciones de cultivo en matraces de Erlenmeyer

Se prepararon medios de cultivo para *Staphylococcus aureus* 049 (StAu 049), *Staphylococcus aureus* I-050 (StAu 050), *Staphylococcus aureus* I-051 (StAu 051), *Staphylococcus aureus* I-052 (StAu 052), *Staphylococcus aureus* I-053 (StAu 053) y *Staphylococcus aureus* I-054 (StAu 054) disolviendo en agua purificada los siguientes componentes: cloruro de sodio: 2 g/l; monohidrogenofosfato de sodio: 2 g/l; acetato de sodio: 0,5 g/l, peptona de soja 40 g/l; glucosa 6 g/l. A continuación se inocularon 0,012 l de medios con 1,5 ml de bacterias congeladas. El cultivo se incubó a 37 °C durante 7 horas bajo agitación a 180 rpm y un pH de 6,9. Se llevaron a cabo etapas de cultivo sucesivas desde 12 hasta 1.000 ml.

## Condiciones de cultivo en prefermentadores

35 Se prepararon para los prefermentadores los mismos medios que en la etapa precedente, pero con adición de polipropilenglicol 0,06 - 0,10 ml/l. Los medios se esterilizaron *in situ* a 123 °C durante 30 min. Se transfirieron a prefermentadores, bajo agitación y aireación, 1.000 ml del cultivo de la etapa anterior. La temperatura de incubación se reguló a 37 ± 2 °C. El pH no se reguló durante el cultivo. Después de 6 horas, los 2 prefermentadores se transfirieron a fermentadores.

## 40 Cultivo en fermentadores

Se prepararon medios de cultivo para StAu 049 disolviendo en agua purificada los siguientes componentes: cloruro de sodio 2 g/l; monohidrogenofosfato de sodio 2 g/l; acetato de sodio 0,5 g/l; peptona de soja 40 g/l; polipropilenglicol 0,04 ml/l. Los medios se esterilizaron *in situ*. Se añadió glucosa (14 g/l) al cultivo. La temperatura de incubación se reguló a 37 °C, bajo agitación y aireación. El pH se reguló a 6,4 ± 0,5. Después de 7 horas, los cultivos se inactivaron mediante un tratamiento térmico a una temperatura de 90 a 100 °C y se transfirieron a un tanque de cosecha. A continuación se separó la biomasa de los medios de cultivo mediante centrifugación. La biomasa se dividió en una serie de alícuotas que contenían una determinada cantidad de peso en seco de biomasa.

El peso en seco de biomasa en cada alícuota fue: StAu 049: 327 g, StAu 050: 297 g, StAu 051: 375 g, StAu 052: 363 g, StAu 053: 446 g y StAu 054: 365 g.

50 Ejemplo 1.3: Cultivos de *Klebsiella*

## Condiciones iniciales de cultivo

Se prepararon medios de cultivo para *Klebsiella pneumoniae* NCTC 5050 (Klba 5050), *Klebsiella pneumoniae* NCTC 5056 (Klba 5056) y *Klebsiella pneumoniae* NCTC 204 (Klba 204) disolviendo en agua purificada los siguientes componentes: cloruro de sodio: 2 g/l; monohidrogenofosfato de sodio: 2 g/l; acetato de sodio: 0,5 g/l, peptona de

soja 40 g/l; glucosa 6 g/l. A continuación se inocularon 0,012 l de medios con 1,5 ml de bacterias congeladas. El cultivo se incubó a 37 °C durante 10 horas bajo agitación y un pH inicial ajustado a 6,9. Se llevaron a cabo etapas de cultivo sucesivas desde 0,012 hasta 1,0 litros.

Condiciones de cultivo para Klba 5050 en prefermentadores

- 5 Se prepararon para los prefermentadores los mismos medios que en la etapa anterior, pero con adición de polipropilenglicol 0,06 ml/l. Se transfirió a prefermentadores un litro de cultivo de la etapa anterior. La temperatura de incubación se reguló a 37 °C, bajo agitación y aireación. El pH no se reguló durante el cultivo. Después de 6 horas, los dos prefermentadores se transfirieron a un fermentador.

Condiciones de cultivo en fermentadores

- 10 Se prepararon medios de cultivo para Klba 5050 disolviendo en agua purificada los siguientes componentes: cloruro de sodio 2 g/l; monohidrogenofosfato de sodio 2 g/l; acetato de sodio 0,5 g/l; peptona de soja 40 g/l y polipropilenglicol 0,02 ml/l. Los medios se esterilizaron *in situ* y se añadieron 21 g/l de glucosa. La temperatura de incubación se reguló a 37 °C, bajo agitación y aireación. El pH se reguló a 6,6 durante el cultivo. Después de 8 horas, los cultivos se inactivaron mediante un tratamiento térmico a una temperatura de 90 a 100 °C y se transfirieron a un tanque de cosecha. A continuación se separó la biomasa de los medios de cultivo mediante centrifugación. El peso en seco de biomasa en cada alícuota fue: Klba 5050: 393 g, Klba 5056: 455 g y Klba 204: 440 g.

Ejemplo 1.4: Cultivos de *Moraxella catarrhalis*

Condiciones iniciales de cultivo

- 20 Se prepararon medios de cultivo para *Moraxella catarrhalis* NCTC 3622 (NeCa 3622); *Moraxella catarrhalis* NCTC 3625 (NeCa 3625) y *Moraxella catarrhalis* I-045 (NeCa 045) disolviendo en agua purificada los siguientes componentes: cloruro de sodio: 3 g/l; monohidrogenofosfato de sodio: 2 g/l; acetato de sodio: 0,5 g/l, peptona de soja 40 g/l; almidón 0,1 g/l; inosina: 0,1 g/l; cloruro de calcio: 0,02 g/l; cloruro de potasio: 0,1 g/l; bicarbonato de sodio: 0,6 g/l; piruvato de sodio: 0,06 g/l; solución metálica 0,5 ml/l (composición de la solución metálica: sulfato de cobre 3 mg/l; cloruro de hierro 830 mg/l; sulfato de cinc: 860 mg/l; ácido sulfúrico: 1,1 mg/l); dipéptido ALA-GLN (200 mg/ml en solución de NaCl al 0,9 %): 10 mg/l (para la primera etapa de cultivo 50 mg/l; para la etapa de cultivo de 1 litro 10 mg/l). A continuación se inocularon 0,012 l de medios con 1,5 ml de bacterias congeladas. El cultivo se incubó a 37 °C durante 10 horas bajo agitación. El pH inicial se ajustó a 7,2. Se llevaron a cabo etapas de cultivo sucesivas desde 0,012 hasta 1,0 litros en las mismas condiciones.

- 30 Cultivo en prefermentadores

Se prepararon para los prefermentadores los mismos medios que en la etapa anterior, pero con adición de polipropilenglicol 0,06 - 0,10 ml/l, y se ajustó la concentración de ALA-GLN a 4 mg/l. Los medios se esterilizaron *in situ*. Se transfirió a prefermentadores un litro de cultivo de la etapa anterior. La temperatura de incubación se reguló a 33 °C, bajo agitación y aireación. El pH no se reguló durante el cultivo. Después de 10 horas, los 2 prefermentadores se transfirieron a fermentadores.

35

Condiciones de cultivo en fermentadores

- 40 Se prepararon para los prefermentadores los mismos medios que en la etapa Erlenmeyer, pero con adición de polipropilenglicol 0,06 ml/l y sin ALA-GLN ni glucosa. La temperatura de incubación se reguló a 33 °C, bajo agitación y aireación. El pH no se reguló durante el cultivo. Después de 10,5 horas, los cultivos se inactivaron mediante un tratamiento térmico a una temperatura de 90 a 100 °C y se transfirieron a un tanque de cosecha. A continuación se separó la biomasa de los medios de cultivo mediante centrifugación. El peso en seco de biomasa en cada alícuota fue: NeCa 3622: 361 g, NeCa 3625: 351 g y NeCa 045: 223 g.

Ejemplo 1.5: Cultivos de *Streptococcus*

Condiciones iniciales de cultivo

- 45 Se prepararon medios de cultivo para *Streptococcus pneumoniae* NCTC 7465 (StPn 7465), *Streptococcus pneumoniae* NCTC 7466 (StPn 7466), *Streptococcus pneumoniae* NCTC 7978 (StPn 7978), *Streptococcus pneumoniae* NCTC 10319 (StPn 710319), *Streptococcus sanguinis* I-046 (StSa 046), *Streptococcus sanguinis* I-047 (StSa 047), *Streptococcus sanguinis* I-048 (StSa 048) y *Streptococcus Pyogenes* NCTC 8191 (StPy 8191) disolviendo en agua purificada los siguientes componentes: cloruro de sodio: 2 g/l; monohidrogenofosfato de sodio: 2 g/l; acetato de sodio: 0,5 g/l, peptona de soja 40 g/l; glucosa 6 g/l; suero de caballo; 50 ml/l. Tras una esterilización se inocularon 0,012 ml de medios con 1,5 ml de bacterias congeladas. El cultivo se incubó a 37 °C durante 14 horas, bajo agitación. A continuación, 10 ml de este cultivo se transfirieron a matraces que contenían 150 ml de medios de cultivo y se incubaron de nuevo en las mismas condiciones durante 10 horas. Se llevó a cabo una etapa final en las mismas condiciones en un matraz de mayor tamaño que contenía 1.000 ml de medios de cultivo con 20 ml/l de

50

suero de caballo antes de su adición al prefermentador.

#### Cultivo en prefermentadores

5 Se prepararon para los prefermentadores los mismos medios que en la etapa anterior, con adición de polipropilenglicol 0,06 ml/l y una concentración de suero de caballo de 8 ml/l. Se transfirió a dos prefermentadores un litro del cultivo anterior. La temperatura de incubación se reguló a 30 °C, bajo agitación. El pH no se reguló durante el cultivo. Después de 14 horas, los 2 prefermentadores se transfirieron a un fermentador.

#### Cultivo en fermentadores

10 Se prepararon para los prefermentadores los mismos medios que en la etapa Erlenmeyer, pero con adición de polipropilenglicol 0,06 ml/l y una concentración de suero de caballo de 1,2 ml/l. Durante el cultivo se añadieron 15,75 kg de glucosa. La temperatura de incubación se reguló a 37 °C, bajo agitación. El pH se reguló a 6,4 con KOH concentrado. Después de 9,25 horas, los cultivos se inactivaron mediante un tratamiento térmico a una temperatura de 90 a 100 °C y se transfirieron a un tanque de cosecha. A continuación se separó la biomasa de los medios de cultivo mediante centrifugación. StSa 046, StSa 047, StSa 048 y StPy 8191 se airearon con aire esterilizado y no necesitaron adición de suero de caballo para el cultivo. El peso en seco de biomasa en cada alícuota fue: StPn 15 7465: 134 g, StPn 7466: 142 g, StPn 7978: 134 g, StPn 10319: 153 g, StSa 046: 246 g, StSa 047: 232 g, StSa 048: 353 g y StPy 8191: 269 g.

#### Ejemplo 2: Lisis bacteriana

##### HAIN 8467 EJEMPLO 2.1

20 Se descongelaron alícuotas de Hain 8467 del Ejemplo de Fermentación 1.1 de biomasa bacteriana a temperatura ambiente y se diluyeron las mismas con una solución salina (8 g/l de NaCl) para alcanzar los 79 g/l de peso en seco. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,2 M. La lisis se incubó durante 120 horas a 35-40 °C, bajo agitación continua. Durante la lisis se vigiló el pH de manera que no descendiese más de 0,5 unidades de pH. Resultados: 25 82,2 mg/ml de peso en seco solubilizado (PSS) y 32,4 mg/ml de proteínas (Prot) y 6,2 mg/ml de aminoácidos (AA) totales calculados en ácido glutámico (147,1 g/mol), medido mediante OPA, 2,40 mg/ml de azúcares reductores medidos mediante OPA (Carbohidratos).

30 La concentración de proteínas (Prot) se midió mediante un ensayo de Lowry (véase la Farmacopea Europea 2.5.33, bajo "proteína total - método 2"). La concentración de aminoácido (AA) libre total se midió convirtiendo aminoácidos en derivados de isoindol y midiendo la absorbancia a 340 nm, según Roth M., Fluorescence reaction for amino acids, *Anal. Chem.*, 43, 880-882 (1971). Los resultados se expresan en equivalentes de ácido glutámico. La concentración de azúcar (Carbohidratos) se ensayó tras una hidrólisis ácida y una derivatización según D. Herbert et al., *Meth. Microbiol.* 5B: 266 y siguientes (1971).

##### HAIN 8467 EJEMPLO 2.2

35 Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.1 hasta los 58,2 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,2 M. La lisis se incubó durante 5 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (peso en seco soluble (PSS): 70,0 mg/ml; proteína Lowry (Prot): 30,0 mg/ml; aminoácidos (AA): 6,0 mg/ml; Carbohidratos: 2,60 mg/ml). Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 18,7 µM, C2: 20,8 µM, C3: 12,1 µM.

##### HAIN 8467 EJEMPLO 2.3

40 Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.1 hasta los 20 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,045 M. La lisis se incubó durante 5 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 29,99 mg/ml; Prot: 4,8 mg/ml; Carbohidratos: 0,2 mg/ml).

##### HAIN 8467 EJEMPLO 2.4 (OP0662L)

45 Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.1 hasta los 12,5 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,05 M. La lisis se incubó durante 2 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 11,2 mg/ml; Prot: <0,2 mg/ml; AA: 2,0 mg/ml; Carbohidratos: 0,4 mg/ml). Porcentaje de D-aminoácidos: 15 % D-Ala, 9 % D-Leu, 45 % D-Ser, 21 % D-Asx, 15 % D-Met, 11 % D-Phe, 9 % D-Glx.

##### HAIN 8467 EJEMPLO 2.5

50 Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.1 hasta los 127 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,7 M. La lisis se incubó durante 2 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 157,2 mg/ml; Prot: 86 mg/ml; AA: 20,0 mg/ml; Carbohidratos: 4,0 mg/ml). Porcentaje de D-aminoácidos: 22 % D-Ala, 11 % D-Leu, 54 % D-Ser, 41 % D-Asx, 35 % D-Met, 32 % D-Phe, 29 % D-Glx, 6 % D-Tyr. Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 9,1 µM, C2: 18,5 µM, C3: 3,1 µM.

##### HAIN 8467 EJEMPLO 2.6

5 Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.1 hasta los 12,5 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,05 M. La lisis se incubó durante 3 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 10,8 mg/ml; Prot: menos de 0,5 mg/ml; AA: 2,0 mg/ml; Carbohidratos: 0,4 mg/ml). Porcentaje de D-aminoácidos: 10 % D-Ala, 9 % D-Leu, 56 % D-Ser, 22 % D-Asx, 16 % D-Met, 13 % D-Phe, 11 % D-Glx. Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 20,2 µM, C2: 26,7 µM, C3: 4,3 µM.

#### HAIN 8467 EJEMPLO 2.7

10 Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.1 hasta los 127 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,7 M. La lisis se incubó durante 3 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 168,8 mg/ml; Prot: 90 mg/ml; AA: 22 mg/ml; Carbohidratos: 4,2 mg/ml). Porcentaje de D-aminoácidos: 36 % D-Ala, 8 % D-Leu, 9 % D-Ser, 44 % D-Asx, 42 % D-Met, 37 % D-Phe, 37 % D-Glx, 37 % D-Tyr.

#### HAIN 8467 EJEMPLO 2.8

15 Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.1 hasta los 12,5 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,7 M. La lisis se incubó durante 10 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 47,2 mg/ml; Prot: menos de 0,2 mg/ml; AA: 4,0 mg/ml; Carbohidratos: 0,2 mg/ml). Porcentaje de D-aminoácidos: 3 % D-Ala, 13 % D-Leu, 54 % D-Ser, 45 % D-Asx, 43 % D-Met, 42 % D-Phe, 41 % D-Glx. Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 7,5 µM, C2: 16,0 µM, C3: 8,6 µM.

#### HAIN 8467 EJEMPLO 2.9

20 Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.1 hasta los 127 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,05 M. La lisis se incubó durante 196 horas a 35-40 °C, bajo agitación continua. Porcentaje de D-aminoácidos: 14 % D-Ala, 5 % D-Asx, 11 % D-Met, 5 % D-Glx.

#### STPY 8191 EJEMPLO 2.10

25 Se descongeló a temperatura ambiente una alícuota de StPy 8191 del Ejemplo 1.5, que contenía 269 g de material bacteriano, y se diluyó la misma con una solución salina (8 g/l de NaCl) para alcanzar los 59,8 g/l de peso en seco. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,2 M. Después, la lisis se incubó durante 192 horas a 35-40 °C, bajo agitación continua. Durante la lisis se vigiló el pH de manera que no descendiese más de 0,5 unidades de pH (PSS: 61,92 mg/ml; Prot: 31,68 mg/ml; AA: 7,2 mg/ml; Carbohidratos: 7,2 mg/ml). Porcentaje de D-aminoácidos: 22 % D-Ala, 11 % D-Leu, 54 % D-Ser, 41 % D-Asx, 35 % D-Met, 32 % D-Phe, 29 % D-Glx, 6 % D-Tyr. Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 4,9 µM, C2: 11,8 µM, C3: 6,7 µM.

#### 30 STSA 046 EJEMPLO 2.11

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 30 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,022 N. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua.

#### STPY 8191 EJEMPLO 2.12

35 Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 100 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,7 M. La lisis se incubó durante 2 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 120,2 mg/ml; Prot: 45,6 mg/ml; AA: 15,2 mg/ml; Carbohidratos: 2,8 mg/ml). Porcentaje de D-aminoácidos: 35 % D-Ala, 13 % D-Leu, 57 % D-Ser, 44 % D-Asx, 40 % D-Met, 39 % D-Phe, 43 % D-Glx.

#### STPY 8191 EJEMPLO 2.13

40 Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 12,7 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,1 M. La lisis se incubó durante 2 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 12,5 mg/ml; Prot: <0,2 mg/ml; AA: 0,8 mg/ml; Carbohidratos: 0,1 mg/ml). Porcentaje de D-aminoácidos: 24 % D-Ala, 13 % D-Leu, 52 % D-Ser, 28 % D-Asx, 8 % D-Met, 8 % D-Phe, 23 % D-Glx, 6 % D-Tyr.

#### STPY 8191 EJEMPLO 2.14

45 Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 100 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,1 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 41,4 mg/ml; Prot: 3,2 mg/ml; AA: 4 mg/ml; Carbohidratos: 1,5 mg/ml).

STPY 8191 EJEMPLO 2.15

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 12,7 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,7 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 52,5 mg/ml; Prot: 0,8 mg/ml; AA: 3,2 mg/ml; Carbohidratos: 0,6 mg/ml).

5 STPY 8191 EJEMPLO 2.16

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 100 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,7 M. La lisis se incubó durante 10 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 147,2 mg/ml; Prot: 53,6 mg/ml; AA: 24,8 mg/ml; Carbohidratos: 5,4 mg/ml). Porcentaje de D-aminoácidos: 44 % D-Ala, 26 % D-Leu, 11 % D-Ser, 45 % D-Asx, 43 % D-Met, 42 % D-Phe, 46 % D-Glx. Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml: 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 9,7 µM, C2: 17,4 µM, C3: 2,5 µM.

10

STPY 8191 EJEMPLO 2.17

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 12,7 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,1 M. La lisis se incubó durante 10 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 14,7 mg/ml; Prot: 0 mg/ml; AA: 0,8 mg/ml; Carbohidratos: 0,2 mg/ml). Porcentaje de D-aminoácidos: 28 % D-Ala, 9 % D-Ser, 36 % D-Asx, 33 % D-Met, 32 % D-Phe, 31 % D-Glx. Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 5,8 µM, C2: 12,1 µM, C3: 6,8 µM.

15

STSA 046 EJEMPLO 2.18

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 68 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,25 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 90,72 mg/ml; Prot: 47,68 mg/ml; AA: 9,36 mg/ml; Carbohidratos: 2,48 mg/ml).

20

STSA 047 EJEMPLO 2.19

Se diluye biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 68 g/l. Se lleva a cabo una alcalinización con NaOH 0,25 M. La lisis se incuba durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua.

STSA 047 EJEMPLO 2.20

Se diluye biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 60 g/l. Se lleva a cabo una alcalinización con NaOH 0,33 M. La lisis se incuba durante 2 días a 35-40 °C, bajo agitación continua.

25

STSA 048 EJEMPLO 2.21

Se diluye biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 62 g/l. Se lleva a cabo una alcalinización con NaOH 0,33 M. La lisis se incuba durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua.

30

STPY 8191 EJEMPLO 2.22

Se diluye biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 55 g/l. Se lleva a cabo una alcalinización con NaOH 0,33 M. La lisis se incuba durante 4 días a 35-40 °C, bajo agitación continua.

STPN 7978 EJEMPLO 2.23

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 38,7 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,25 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 66,4 mg/ml; Prot: 25,4 mg/ml; AA: 6,0 mg/ml; Carbohidratos: 2,5 mg/ml). Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 10,2 µM, C2: 20,7 µM, C3: 20,8 µM.

35

STPN 7978 EJEMPLO 2.24

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 30 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,022 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 30,4 mg/ml; Prot: 2,20 mg/ml; Carbohidratos: 0,40 mg/ml).

40

STPN 7978 EJEMPLO 2.25

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 60 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,7 M. La lisis se incubó durante 2 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 59 mg/ml; Prot: 17 mg/ml; AA: 7,0 mg/ml; Carbohidratos: 1,8 mg/ml). Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 9,1 µM, C2: 13,4 µM, C3: 1,4 µM.

45

STPN 7978 EJEMPLO 2.26

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 12,5 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,1 M. La lisis se incubó durante 2 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 17,8 mg/ml; Prot: <0,2 mg/ml; AA: 2,0 mg/ml; Carbohidratos: 0,7 mg/ml).

5 STPN 7978 EJEMPLO 2.27

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 60 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,1 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 43,6 mg/ml; Prot: 6 mg/ml; AA: 10 mg/ml; Carbohidratos: 1,5 mg/ml).

STPN 7978 EJEMPLO 2.28

10 Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 12,5 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,7 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 55,4 mg/ml; Prot: 2 mg/ml; AA: 4 mg/ml; Carbohidratos: 0,7 mg/ml).

STPN 7978 EJEMPLO 2.29

15 Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 60 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,7 M. La lisis se incubó durante 10 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 118,4 mg/ml; Prot: 31 mg/ml; AA: 19 mg/ml; Carbohidratos: 4,1 mg/ml). Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 5,8 µM, C2: 12,1 µM, C3: 2,8 µM.

STPN 7978 EJEMPLO 2.30

20 Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 12,5 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,1 M. La lisis se incubó durante 10 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 18,4 mg/ml; Prot: <0,2 mg/ml; AA: 2 mg/ml; Carbohidratos: 0,5 mg/ml).

STPN 7465 EJEMPLO 2.31

25 Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 52,5 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,25 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 69,4 mg/ml; Prot: 32,3 mg/ml; AA: 6,0 mg/ml; Carbohidratos: 1,7 mg/ml).

STPN 7466 EJEMPLO 2.32

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 40,0 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,25 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 60,6 mg/ml; Prot: 29,0 mg/ml; AA: 6,0 mg/ml; Carbohidratos: 1,50 mg/ml).

30 STPN 10319 EJEMPLO 2.33

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 41,2 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,25 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 60,4 mg/ml; Prot: 28,4 mg/ml; AA: 6,0 mg/ml; Carbohidratos: 1,1 mg/ml).

STSA 046 EJEMPLO 2.34

35 Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 58,9 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,25 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 83,2 mg/ml; Prot: 7,2 mg/ml; AA: 8,39 mg/ml; Carbohidratos: 2,16 mg/ml).

STSA 047 EJEMPLO 2.35

40 Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 50,4 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,25 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 60,64 mg/ml; Prot: 27,92 mg/ml; AA: 7,2 mg/ml; Carbohidratos: 3,52 mg/ml).

STSA 048 EJEMPLO 2.36

45 Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.5 hasta los 66,2 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,25 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 72,96 mg/ml; Prot: 36,16 mg/ml; AA: 7,2 mg/ml; Carbohidratos: 3,28 mg/ml).

## NECA I045 EJEMPLO 2.37

Se descongeló a temperatura ambiente una alícuota de NeCa I045 del Ejemplo 1.4, que contenía 223 g de material bacteriano, y se diluyó la misma con una solución salina (8 g/l de NaCl) para alcanzar los 22,8 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,2 M. La lisis se incubó durante 192 horas a 35-40 °C, bajo agitación continua. Durante la lisis se vigiló el pH de manera que no descendiese más de 0,5 unidades de pH (PSS: 41,29 mg/ml; Prot: 17,45 mg/ml; AA: 3,41 mg/ml; Carbohidratos: 3,4 mg/ml). Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 4,2 µM, C2: 14,8 µM, C3: 13,4 µM.

## NECA I045 EJEMPLO 2.38

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.4 hasta los 20,5 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,2 M. La lisis se incubó durante 3 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 36,6 mg/ml; Prot: 16,4 mg/ml; AA: 3,63 mg/ml; Carbohidratos: 0,77 mg/ml).

## NECA I045 EJEMPLO 2.39

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.4 hasta los 51,0 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,7 M. La lisis se incubó durante 2 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 75,69 mg/ml; Prot: 30,8 mg/ml; AA: 10,8 mg/ml; Carbohidratos: 1,14 mg/ml). Porcentaje de D-aminoácidos: 40 % D-Ala, 45 % D-Asx, 42 % D-Met, 40 % D-Phe, 46 % D-Glx, 48 % D-Lys. Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 4,9 µM, C2: 14,3 µM, C3: 3,6 µM.

## NECA I045 EJEMPLO 2.40

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.4 hasta los 13 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,1 M. La lisis se incubó durante 2 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 15,08 mg/ml; Prot: 7,7 mg/ml; AA: 1,5 mg/ml; Carbohidratos: 0,28 mg/ml). Porcentaje de D-aminoácidos: 21 % D-Ala, 67 % D-Ser, 31 % D-Asx, 25 % D-Met, 12 % D-Lys.

## NECA I045 EJEMPLO 2.41

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.4 hasta los 51,0 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,1 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 41,23 mg/ml; Prot: 26,2 mg/ml; AA: 4,6 mg/ml; Carbohidratos: 0,98 mg/ml).

## NECA I045 EJEMPLO 2.42

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.4 hasta los 13 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,7 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 48,43 mg/ml; Prot: 7,7 mg/ml; AA: 4,3 mg/ml; Carbohidratos: 0,22 mg/ml).

## NECA I045 EJEMPLO 2.43

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.4 hasta los 51,0 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,7 M. La lisis se incubó durante 10 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 83,02 mg/ml; Prot: 28,9 mg/ml; AA: 15 mg/ml; Carbohidratos: 1,11 mg/ml). Porcentaje de D-aminoácidos: 44 % D-Ala, 48 % D-Ser, 47 % D-Asx, 45 % D-Met, 43 % D-Phe, 50 % D-Glx. Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 5,1 µM, C2: 12,0 µM, C3: 7,5 µM.

## NECA I045 EJEMPLO 2.44

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.4 hasta los 13 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,1 M. La lisis se incubó durante 10 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 15,26 mg/ml; Prot: 8,6 mg/ml; AA: 1,8 mg/ml; Carbohidratos: 0,22 mg/ml). Porcentaje de D-aminoácidos: 31 % D-Ala, 42 % D-Ser, 38 % D-Asx, 36 % D-Met, 35 % D-Phe, 37 % D-Glx. Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 4,1 µM, C2: 13,9 µM, C3: 6,0 µM.

## NECA I045 EJEMPLO 2.45

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.4 hasta los 9 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,066 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 20,62 mg/ml; Prot: 5,57 mg/ml; Carbohidratos: 0,06 mg/ml).

## NECA NCTC3622 EJEMPLO 2.46

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.4 hasta los 20,1 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,2 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 35,69 mg/ml; Prot: 14,25 mg/ml; AA: 3,4 mg/ml; Carbohidratos: 0,71 mg/ml).

## NECA NCTC3625 EJEMPLO 2.47

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.4 hasta los 9,7 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,2 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 38,83 mg/ml; Prot: 15,54 mg/ml; AA: 3,4 mg/ml; Carbohidratos: 0,95 mg/ml).

## 5 KLPN 204 EJEMPLO 2.48

Se descongeló a temperatura ambiente una alícuota de KIPn 204 del Ejemplo 1.3, que contenía 440 g de material bacteriano, y se diluyó la misma con una solución salina (8 g/l de NaCl) para alcanzar los 37,7 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,2 M. La lisis se incubó durante 192 horas a 35-40 °C, bajo agitación continua. Durante la lisis se vigiló el pH de manera que no descendiese más de 0,5 unidades de pH (PSS: 51,77 mg/ml; Prot: 27,66 mg/ml; AA: 4,2 mg/ml; Carbohidratos: 1,03 mg/ml). Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 0,6 µM, C2: 2,8 µM, C3: 1,8 µM.

## KLPN 204 EJEMPLO 2.49

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.3 hasta los 9 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,013 N. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 25,71 mg/ml; Prot: 4,91 mg/ml; Carbohidratos: 0,51 mg/ml).

## KLPN 204 EJEMPLO 2.50

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.3 hasta los 99 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,1 M. La lisis se incubó durante 2 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 50,63 mg/ml; Prot: 15,4 mg/ml; AA: 2,9 mg/ml; Carbohidratos: 2,1 mg/ml). Porcentaje de D-aminoácidos: 5 % D-Ala, 6 % D-Asx.

## 20 KLPN 204 EJEMPLO 2.51

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.3 hasta los 13 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,7 M. La lisis se incubó durante 2 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 52,69 mg/ml; Prot: 5,7 mg/ml; AA: 2,3 mg/ml; Carbohidratos: 0,3 mg/ml). Porcentaje de D-aminoácidos: 36 % D-Ala, 8 % D-Ser, 45 % D-Asx, 7 % D-Met, 27 % D-Phe, 40 % D-Glx, 29 % D-Lys. Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 0,5 µM, C2: 0,8 µM, C3: 6,0 µM.

## KLPN 204 EJEMPLO 2.52

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.3 hasta los 99 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,7 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 136,34 mg/ml; Prot: 58,9 mg/ml; AA: 20,6 mg/ml; Carbohidratos: 3,4 mg/ml).

## 30 KLPN 204 EJEMPLO 2.53

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.3 hasta los 13 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,1 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 18,06 mg/ml; Prot: 6,3 mg/ml; AA: 1,1 mg/ml; Carbohidratos: 0,3 mg/ml). Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 0,5 µM, C2: 1,6 µM, C3: 1,9 µM.

## 35 KLPN 204 EJEMPLO 2.54

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.3 hasta los 99 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,1 M. La lisis se incubó durante 10 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 58,06 mg/ml; Prot: 20 mg/ml; AA: 4,6 mg/ml; Carbohidratos: 2,7 mg/ml).

## KLPN 204 EJEMPLO 2.55

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.3 hasta los 13 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,7 M. La lisis se incubó durante 10 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 52,57 mg/ml; Prot: 5,7 mg/ml; AA: 4,0 mg/ml; Carbohidratos: 0,3 mg/ml). Porcentaje de D-aminoácidos: 43 % D-Ala, 25 % Val, 5 % D-Ser, 46 % D-Asx, 46 % D-Met, 45 % D-Phe, 44 % D-Glx, 38 % D-Lys. Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 0,5 µM, C2: 0,6 µM, C3: 2,6 µM.

## 45 KLPN 5056 EJEMPLO 2.56

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.3 hasta los 39,4 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,2 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 52,69 mg/ml; Prot: 27,83 mg/ml; AA: 4,0 mg/ml; Carbohidratos: 1,09 mg/ml).



## KLPN 5050 EJEMPLO 2.57

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.3 hasta los 34,2 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,2 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 48,23 mg/ml; Prot: 26,57 mg/ml; AA: 4,0 mg/ml; Carbohidratos: 1,03 mg/ml).

## 5 STAU I051 EJEMPLO 2.58

Se descongeló a temperatura ambiente una alícuota de StAu I051 del Ejemplo 1.2, que contenía 375 g de material bacteriano, y se diluyó la misma con una solución salina (8 g/l de NaCl) para alcanzar los 55,2 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,2 M. La lisis se incubó durante 192 horas a 35-40 °C, bajo agitación continua. Durante la lisis se vigiló el pH de manera que no descendiese más de 0,5 unidades de pH (PSS: 66,4 mg/ml; Prot: 34,08 mg/ml; AA: 6,4 mg/ml; Carbohidratos: 0,64 mg/ml). Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 0,6 µM, C2: 0,8 µM, C3: 1,4 µM.

## STAU I051 EJEMPLO 2.59

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.2 hasta los 51 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,2 M. La lisis se incubó durante 9 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 65,31 mg/ml; Prot: 25,56 mg/ml; AA: 6,57 mg/ml; Carbohidratos: 0,98 mg/ml).

## STAU I051 EJEMPLO 2.60

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.2 hasta los 81 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,7 M. La lisis se incubó durante 2 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 137,2 mg/ml; Prot: 51,2 mg/ml; AA: 20,8 mg/ml; Carbohidratos: 1,6 mg/ml). Porcentaje de D-aminoácidos: 51 % D-Ala, 11 % D-Ser, 43 % D-Asx, 37 % D-Met, 35 % D-Phe, 43 % D-Glx. Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 0,6 µM, C2: 0,8 µM, C3: 1,3 µM.

## STAU I051 EJEMPLO 2.61

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.2 hasta los 13 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,7 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 55,7 mg/ml; Prot: 4,8 mg/ml; AA: 4,8 mg/ml; Carbohidratos: 0,2 mg/ml).

## STAU I051 EJEMPLO 2.62

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.2 hasta los 81 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,7 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 130,1 mg/ml; Prot: 47,2 mg/ml; AA: 24,8 mg/ml; Carbohidratos: 1,4 mg/ml).

## 30 STAU I051 EJEMPLO 2.63

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.2 hasta los 13 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,1 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 18,4 mg/ml; Prot: 4,8 mg/ml; AA: 2,4 mg/ml; Carbohidratos: 0,2 mg/ml). Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 0,5 µM, C2: 0,6 µM, C3: 1,3 µM.

## 35 STAU I051 EJEMPLO 2.64

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.2 hasta los 81 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,7 M. La lisis se incubó durante 10 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 134,6 mg/ml; Prot: 48 mg/ml; AA: 25,6 mg/ml; Carbohidratos: 1,5 mg/ml). Porcentaje de D-aminoácidos: 56 % D-Ala, 10 % D-Ser, 45 % D-Asx, 42 % D-Met, 39 % D-Phe, 73 % D-Tyr, 49 % D-Glx. Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 0,6 µM, C2: 0,7 µM, C3: 1,1 µM.

## STAU I051 EJEMPLO 2.65

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.2 hasta los 13 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,1 M. La lisis se incubó durante 10 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 17,9 mg/ml; Prot: 5,6 mg/ml; AA: 2,4 mg/ml; Carbohidratos: 0,2 mg/ml). Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,02 mg/ml (C1), 0,2 mg/ml (C2), y 2,0 mg/ml (C3): C1: 0,5 µM, C2: 0,6 µM, C3: 3,7 µM.

## STAU I049 EJEMPLO 2.66

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.2 hasta los 52,8 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,2 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 70,08 mg/ml; Prot: 34,4 mg/ml; AA: 6,4 mg/ml; Carbohidratos: 0,64 mg/ml).

50

STAU I050 EJEMPLO 2.67

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.2 hasta los 47,5 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,2 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 64,32 mg/ml; Prot: 32,24 mg/ml; AA: 6,4 mg/ml; Carbohidratos: 0,64 mg/ml).

5 STAU I050 EJEMPLO 2.68

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.2 hasta los 48,5 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,033 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua.

STAU I052 EJEMPLO 2.69

10 Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.2 hasta los 56,9 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,2 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 62,72 mg/ml; Prot: 30,8 mg/ml; AA: 6,4 mg/ml; Carbohidratos: 0,72 mg/ml).

STAU I053 EJEMPLO 2.70

15 Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.2 hasta los 67,3 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,2 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 68,8 mg/ml; Prot: 32,24 mg/ml; AA: 6,4 mg/ml; Carbohidratos: 1,2 mg/ml).

STAU I050 EJEMPLO 2.71

Se diluyó biomasa según el Ejemplo 1.2 hasta los 63,6 g/l. Se llevó a cabo una alcalinización con NaOH 0,2 M. La lisis se incubó durante 8 días a 35-40 °C, bajo agitación continua (PSS: 68,96 mg/ml; Prot: 24,56 mg/ml; AA: 6,4 mg/ml; Carbohidratos: 2,56 mg/ml).

20 Ejemplo 3: Purificación de lisados

Ejemplo 3.1: Extracto clarificado de una cepa gramnegativa y una cepa grampositiva

25 Se mezclaron entre sí 2 l del Ejemplo 2.57 y 2 l del Ejemplo 2.66, se ajustó el pH a 12,0 con la adición de HCl concentrado y se diluyó la mezcla con 2 l de una solución de NaCl a 8 g/l. La mezcla diluida se transfirió a un tanque de microfiltración (MF). La unidad de microfiltración utilizaba un filtro de filtración de flujo tangencial de 0,45 micras (PALL Procette PES 0.45 micron) en un modo de serpenteo (véase la Figura 1). El flujo transversal se ajustó a 2.000 l/h m<sup>2</sup> (LHM) y la presión transmembrana (PTM) se ajustó a 1,3 bares. El permeado de microfiltración se transfirió a un tanque de ultrafiltración (UF).

30 Una vez que el volumen de la mezcla en el tanque de microfiltración alcanzó la mitad del volumen inicial, se puso en marcha la unidad de UF. La unidad de ultrafiltración utilizaba un filtro de filtración de flujo tangencial de 30 kDa (PALL Centrasette PES 30kD). El flujo transversal se ajustó a 1.000 LHM y la PTM se ajustó a 0,5 bares.

35 Los volúmenes en los tanques de MF y UF se mantuvieron en el mismo nivel. En cada volumen de diafiltración se midió la concentración de proteínas por el método de Bradford. [El método de Bradford es un estándar en la técnica. No es necesario citar una referencia, a no ser que diferentes maneras de llevar a cabo el método proporcionen resultados significativamente diferentes]. En el tanque de UF, el contenido de proteínas según Bradford fue de 26,8 mg/ml después de 1 volumen de diafiltración (VDF), 34,8 mg/ml después de 4 VDF y 37,2 mg/ml después de 9 VDF. El flujo de permeado de microfiltración durante la diafiltración fue de 15 LHM. Después de 14 volúmenes de diafiltración se detuvo la UF y se concentró el producto en el tanque de MF. El producto contenía 15,9 mg/ml de proteína. A continuación, el producto se diluyó hasta los 7,4 mg/ml y se filtró a través de un filtro estéril de 0,2 micras (residuo en seco solubilizado (RSS): 21,0 mg/ml, Prot: 7,4 mg/ml, AA: 1,2 mg/ml, glúcidos (Carbohidratos): 0,3 mg/ml, Cloruro: 4,6 mg/ml). Producción de NOx en mg de proteína Lowry mg/ml, 0,03 mg/ml (C1), 0,3 mg/ml (C2), y 3,0 mg/ml (C3): C1: 5,8 µM, C2: 11,4 µM, C3: 1,2 µM.

Ejemplo 3.2: Monocepa de Klba

4 kg del Ejemplo 2.57 se ajustaron a un pH de 12,0 y se diluyeron con 4 l de solución de NaCl de 8 g/l. El lisado diluido se transfirió a un tanque de microfiltración.

45 Los parámetros de microfiltración fueron: Flujo Transversal 2.000 LHM, PTM 1,3 bares, corte: 0,45 µm. Los parámetros de ultrafiltración fueron: Flujo Transversal 1.000 LHM, PTM 0,5 bares, corte: 30 kDa, número de volúmenes de diafiltración: 8.

50 El producto se diluyó hasta los 7,0 mg/ml y se filtró a través de un filtro estéril de 0,2 micras (RSS: 18 mg/ml, Prot: 7,0 mg/ml, AA: 0,8 mg/ml, Carbohidratos: 0,3 mg/ml). Producción de NOx en mg de proteína Lowry/ml, 0,03 mg/ml (C1), 0,3 mg/ml (C2), y 3,0 mg/ml (C3): C1: 5,2 µM, C2: 9,8 µM, C3: 1,1 µM.

Ejemplo 3.3: Monocepa de Moraxella

2 kg del Ejemplo 2.37 se ajustaron a un pH de 10,7 y se diluyeron con 3 l de solución de NaCl de 8 g/l. El lisado diluido se transfirió al tanque de microfiltración.

5 Los parámetros de microfiltración fueron: Flujo Transversal 2.000 LHM, PTM 1,3 bares, corte: 0,45 µm. Los parámetros de ultrafiltración fueron: Flujo Transversal 1.000 LHM, PTM 0,5 bares, corte: 30 kDa, número de volúmenes de diafiltración: 8.

El producto se diluyó hasta los 7,0 mg/ml y se filtró a través de un filtro estéril de 0,2 micras (RSS: 19,4 mg/ml, Prot: 6,8 mg/ml).

Ejemplo 3.4: Monocepa de Pneumoniae

10 5,0 kg del Ejemplo 2.32 se ajustaron a un pH de 12,27 y se diluyeron con 5,0 l de solución de NaCl de 8 g/l. El lisado diluido se transfirió a un tanque de microfiltración.

Los parámetros de microfiltración fueron: Flujo Transversal 2.000 LHM, PTM 1,3 bares, corte: 0,45 µm. Los parámetros de ultrafiltración fueron: Flujo Transversal 1.000 LHM, PTM 0,5 bares, corte: 30 kDa, número de volúmenes de diafiltración: 8.

15 El producto se diluyó hasta los 7,0 mg/ml y se filtró a través de un filtro estéril de 0,2 micras (RSS: 23,3 mg/ml, Prot: 4,3 mg/ml).

Ejemplo 3.5

20 500 ml del Ejemplo 2.45, 500 ml del Ejemplo 2.47 y 500 ml del Ejemplo 2.37 se mezclan y se centrifugan a 9.000 x g. El sobrenadante se filtra a través de filtros sucesivos con porosidades de 0,8 µm, 0,45 µ y 0,2 µm. El pH se ajusta a 10,5 con HCl.

Ejemplo 3.6

25 300 ml del lisado del Ejemplo 2.23, 300 ml del Ejemplo 2.31, 300 ml del Ejemplo 2.32 y 300 ml del Ejemplo 2.33 se mezclaron y se centrifugaron durante 30 minutos a 9.000 x g. El sobrenadante se filtró a través de filtros sucesivos con porosidades de 0,8 µm, 0,45 µ y 0,2 µm. El pH se ajustó a 10,5 con HCl. Resultados analíticos: (RSS: 63,60 mg/ml, Prot: 23,00 mg/ml, AA: 6,00 mg/ml, Carbohidratos: 1,60 mg/ml).

Ejemplo 3.7

30 300 ml del Ejemplo 2.48, 300 ml del Ejemplo 2.56 y 300 ml del Ejemplo 2.57 se mezclaron y se centrifugaron a 9.000 x g. El sobrenadante se filtró a través de filtros sucesivos con porosidades de 0,8 µm, 0,45 µ y 0,2 µm. El pH se ajustó a 10,5 con HCl (RSS: 50,40 mg/ml, Prot: 22,30 mg/ml, AA: 4,0 mg/ml, Carbohidratos: 0,97 mg/ml). Producción de NOx en mg de peso en seco solubilizado/ml, 0,01 mg/ml (C1), 0,1 mg/ml (C2), y 1,0 mg/ml (C3): C1: 1,06 µM, C2: 3,19 µM, C3: 7,62 µM.

Ejemplo 3.8:

35 200 ml del Ejemplo 2.58, 200 ml del Ejemplo 2.66, 200 ml del Ejemplo 2.67, 200 ml del Ejemplo 2.69, 200 ml del Ejemplo 2.70 y 200 ml del Ejemplo 2.71 se mezclaron y se centrifugaron a 9.000 x g. El sobrenadante se filtró a través de filtros sucesivos con porosidades de 0,8 µm, 0,45 µ y 0,2 µm. El pH se ajustó a 10,5 con HCl (RSS: 65,12 mg/ml, Prot: 24,80 mg/ml, AA: 7,2 mg/ml, Carbohidratos: 1,12 mg/ml). Producción de NOx en mg de peso en seco solubilizado/ml, 0,01 mg/ml (C1), 0,1 mg/ml (C2), y 1,0 mg/ml (C3): C1: 0,76 µM, C2: 1,16 µM, C3: 3,79 µM.

Ejemplo 3.9:

40 500 ml del Ejemplo 2.46, 500 ml del Ejemplo 2.47 y 500 ml del Ejemplo 2.37 se mezclaron y se centrifugaron a 9.000 x g. El sobrenadante se filtró a través de filtros sucesivos con porosidades de 0,8 µm, 0,45 µ y 0,2 µm. El pH se ajustó a 10,5 con HCl (RSS: 38,15 mg/ml, Prot: 13,5 mg/ml, AA: 3,4 mg/ml, Carbohidratos: 0,80 mg/ml). Producción de NOx en mg de peso en seco solubilizado/ml, 0,01 mg/ml (C1), 0,1 mg/ml (C2), y 1,0 mg/ml (C3): C1: 2,25 µM, C2: 5,25 µM, C3: 14,21 µM.

Ejemplo 3.10

45 500 ml del Ejemplo 2.34, 500 ml del Ejemplo 2.35, 500 ml del Ejemplo 2.36 y 500 ml del Ejemplo 2.10 se mezclaron y se centrifugaron a 9.000 x g. El sobrenadante se filtró a través de filtros sucesivos con porosidades de 0,8 µm, 0,45 µ y 0,2 µm. El pH se ajustó a 10,5 con HCl (RSS: 69,6 mg/ml, Prot: 28,00 mg/ml, AA: 7,2 mg/ml, Carbohidratos: 2,48 mg/ml). Producción de NOx en mg de peso en seco solubilizado/ml, 0,01 mg/ml (C1), 0,1 mg/ml (C2), y 1,0 mg/ml (C3): C1: 0,95 µM, C2: 1,21 µM, C3: 4,44 µM.

50

## Ejemplo 3.11

10 ml del lisado del Ejemplo 2.61 y 10 ml del Ejemplo 2.27 se centrifugaron a 9.000 x g, por separado. Los sobrenadantes se filtraron a través de filtros sucesivos con porosidades de 0,8 µm, 0,45 µ y 0,2 µm. Se mezclaron 3 ml de cada sobrenadante. El pH se ajustó a 7,2 con HCl. Producción de NOx en mg de peso en seco solubilizado/ml, 0,01 mg/ml (C1), 0,1 mg/ml (C2), y 1,0 mg/ml (C3): C1: 0,34 µM, C2: 0,66 µM, C3: 1,33 µM.

## Ejemplo 3.12

10 ml del Ejemplo 2.58 y 10 ml del Ejemplo 2.61 se centrifugaron a 9.000 x g, por separado. Los sobrenadantes se filtraron a través de filtros sucesivos con porosidades de 0,8 µm, 0,45 µ y 0,2 µm. Se mezclaron entre sí 3 ml de cada sobrenadante. El pH se ajustó a 7,6 con HCl. Producción de NOx en mg de peso en seco solubilizado/ml, 0,01 mg/ml (C1), 0,1 mg/ml (C2), y 1,0 mg/ml (C3): C1: 0,40 µM, C2: 0,44 µM, C3: 0,71 µM.

## Ejemplo 3.13

10 ml del Ejemplo 2.9 y 10 ml del Ejemplo 2.8 se centrifugaron a 9.000 x g, por separado. Los sobrenadantes se filtraron a través de filtros sucesivos con porosidades de 0,8 µm, 0,45 µ y 0,2 µm. Se mezclaron 1,5 ml del primer lisado (Ejemplo 2.9) con 4,5 ml del segundo (Ejemplo 2.8). El pH se ajustó a 7,2 con HCl. Producción de NOx en mg de peso en seco solubilizado/ml, 0,01 mg/ml (C1), 0,1 mg/ml (C2), y 1,0 mg/ml (C3): C1: 8,7 µM, C2: 16,90 µM, C3: 21,1 µM.

## Ejemplo 3.14

10 ml del Ejemplo 2.2 y 10 ml del Ejemplo 2.8 se centrifugaron a 9.000 x g, por separado. El sobrenadante se filtró a través de filtros sucesivos con porosidades de 0,8 µm, 0,45 µ y 0,2 µm. Se mezclaron entre sí 3 ml de cada sobrenadante. El pH se ajustó a 7,5 con HCl. Producción de NOx en mg de peso en seco solubilizado/ml, 0,01 mg/ml (C1), 0,1 mg/ml (C2), y 1,0 mg/ml (C3): C1: 9,2 µM, C2: 11,3 µM, C3: 17,2 µM.

## Ejemplo 3.15

13,2 l de lisis del Ejemplo 2.2, 48,6 l de lisis de mezcla del Ejemplo 3.9, 36,6 l de lisis de mezcla del Ejemplo 3.7, 36 l de lisis de mezcla del ejemplo 3.8, 14,4 l del Ejemplo 3.6 y 18,4 l del Ejemplo 3.10 se mezclaron entre sí y se diluyeron hasta los 334,4 l con una solución de NaCl de 8 g/l. La solución se purificó mediante filtración de flujo tangencial en un sistema doble de circuitos de microfiltración y ultrafiltración, como se ha descrito en el Ejemplo 3.1 (PSS: 21,0 mg/ml; Prot: 6,4 mg/ml; AA: 1,9 mg/ml; Carbohidratos 0,45 mg/ml). Porcentaje de D-aminoácidos: 42 % D-Ala, 12 % Leu, 53 % D-Ser, 37 % D-Asx, 35 % D-Met, 32 % D-Phe, 28 % D-Glx, 8 % D-Tyr, 16 % Lys. Producción de NOx en mg de proteína Lowry mg/ml, 0,03 mg/ml (C1), 0,3 mg/ml (C2), y 3,0 mg/ml (C3): C1: 9,3 µM, C2: 14,3 µM, C3: 11,5 µM.

## Ejemplo 4: Ejemplo comparativo de lisis bacteriana en condiciones de pH más bajo

El Ejemplo 4 representa un proceso que se llevó a cabo en condiciones alcalinas fuera del alcance de la invención. Las concentraciones de NaOH utilizadas para realizar la lisis de bacterias fueron menores de un 0,1 %, lo que llevó a valores pH más bajos.

Se mezclaron los siguientes lisados: 1,18 kg del Ejemplo 2.24, 3,0 kg del ejemplo 2.49, 2,95 kg del Ejemplo 2.69, 1,08 kg del Ejemplo 2.4, 1,51 kg del Ejemplo 2.11 y 3,98 kg del Ejemplo 2.45. Se diluyeron seis kilogramos de la mezcla hasta los 12 kg con solución de NaCl 8 g/l y se ajustó el pH a pH 12,0. Los parámetros de microfiltración fueron: Flujo Transversal 2.000 LHM, PTM 1,3 bares, corte: 0,45 µm. Los parámetros de ultrafiltración fueron: Flujo Transversal 1.000 LHM, PTM 0,5 bares, corte: 30 kDa, número de volúmenes de diafiltración: 12 (RSS: 19,4 mg/ml, Prot: 3,1 mg/ml, AA: 2,0 mg/ml, Carbohidratos: 0,1 mg/ml, LAL: 20.140 UE/ml). Producción de NOx en mg de peso en seco activo/ml, 0,03 mg/ml (C1), 0,3 mg/ml (C2), y 3,0 mg/ml (C3): C1: 9,3 µM, C2: 14,3 µM, C3: 11,5 µM.

Ejemplo 5: Lisis de *Lactobacillus helveticus*

Se descongelan a temperatura ambiente alícuotas de biomasa bacteriana de *Lactobacillus helveticus* obtenida mediante fermentación en un medio vegetal y se diluyen las mismas con agua purificada para alcanzar los 80 g/l de concentración de peso en seco. Se lleva a cabo una alcalinización con NaOH 0,2 M. La lisis se incubó durante 2 días a 35-40 °C, bajo agitación continua. Durante la lisis se vigila el pH de manera que no descienda más de 0,5 unidades de pH.

## Ejemplo 6: Inmunoprotección contra la infección con virus de la gripe por aerosol en ratones

Este experimento estaba enfocado a investigar la actividad inmunológica no específica de ciertas realizaciones de la invención evaluando su eficacia contra un virus, concretamente el H1N1. Se compraron al Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlín, ratones BALB/c hembras de seis semanas de edad y se utilizaron éstos para todos los experimentos. Se mantuvo a los animales en condiciones normales, a una temperatura ambiente de 22 °C y una humedad relativa del 60 ± 5 %. El programa de luz se ajustó a un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas. Se alimentó

a los animales con una dieta estándar de pelets (Altromin 1314, Altromin, Lage, Alemania) y se les proporcionó agua corriente *ad libitum*.

Tratamiento previo

5 Un total de 60 ratones fueron divididos en 3 grupos de 20 ratones cada uno, con 2 grupos de tratamiento y 1 grupo de control. Los animales (2 grupos) recibieron un tratamiento previo bien con 1 mg, bien con 10 mg por ratón una vez al día durante 10 días consecutivos, o PBS de control (1 grupo). Al final del tratamiento previo se administró a todos los ratones un aerosol de un virus de la gripe A/PR/8/34 (H1N1) adaptado a ratones. La DL<sub>50</sub> para ratones utilizando esta cepa es normalmente de 10<sup>-4,5</sup> por la vía intranasal y de 10<sup>-1,7</sup> por la vía de aerosol. La dosificación utilizada para provocar la infección en estos experimentos se seleccionó para proporcionar una dilución capaz de causar una infección con virus de la gripe claramente sintomática, pero no 100 % letal.

10 Se observó diariamente la mortalidad en grupos de 10 ratones durante 10 días. Los resultados presentados en la Figura 3 muestran que una dosis de 10 mg/ratón del extracto en las condiciones de dosificación de este experimento podía conferir una protección completa contra la reinfección. En cambio, sólo un 70 % de los ratones de control sobrevivió a la infección con virus de la gripe. La supervivencia en el grupo que recibió 1 mg/ratón del fármaco fue de un 70 %.

Síntomas clínicos observados después de la infección con virus de la gripe en ratones tratados

20 Se observaron diariamente grupos de 10 ratones cada uno en cuanto a síntomas clínicos de infección con virus de la gripe. Los resultados de los síntomas clínicos se muestran en la tabla siguiente. Los animales a los que se les habían administrado 10 mg de dosis del extracto mostraron síntomas clínicos leves 2 días después y estaban aparentemente sanos antes que los ratones del grupo de control, lo que indicaba un efecto beneficioso de la dosis mayor. Entre los grupos tratados con 1 mg de dosis y los controles no hubo diferencias significativas en los resultados clínicos.

Grupo	Días tras infección con virus de la gripe															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
PBS	0	0	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++/	++/	++	++	++
TTT 1 mg	0	0	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++/	++	++	+
TTT 10 mg	0	0	0	0	+	+/	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	0

TTT = Tratamiento con el extracto de la presente invención

Para los resultados de los síntomas clínicos se tomaron en consideración sólo los animales supervivientes.

Código: 0: sin erizamiento del pelo, salud aparente, y + a +++: aumento progresivo en el erizamiento del pelo; disminución progresiva en movimiento y actividad general.

Títulos de anticuerpo de inhibición de hemaglutinación por gripe de ratones tratados

25 Se recogieron sueros el día 10 después de las provocaciones con virus de la gripe, 3 ratones por grupo, después de la primera y la segunda infección. Los sueros obtenidos de animales inmunizados se almacenaron a -20 °C. Todos los sueros se sometieron a un tratamiento previo con enzima destructora de receptores para eliminar inhibidores no específicos. Se realizaron ensayos de inhibición de hemaglutinación (IH) por gripe en placas de microtitulación utilizando un 0,5 % de hematíes de pollo y 4 unidades de hemaglutinación utilizando procedimientos estándar recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2002). En la tabla siguiente se presentan los resultados, que muestran títulos de anticuerpo de IH en media geométrica contra virus de la gripe A/PR/8/34 (H1N1).

30 No hubo diferencias significativas entre los grupos tratados y los controles después de la primera infección.

Grupo	Título D13	*TMG	Título D34	*TMG
<b>PBS</b>	320	403	640	640
	320		640	
	640		640	
<b>TTT 1 mg</b>	320	403	320	320
	320		320	
	640		320	
<b>TTT 10 mg</b>	320	320	640	<b>1612</b>
	320		2560	
	320		2560	

TTT = Tratamiento con el extracto de la presente invención

Los sueros se obtuvieron 10 días después de una infección por provocación con virus de la gripe.

\*Título en media geométrica

5 Por lo tanto, se administró a los ratones una segunda infección (de refuerzo) por provocación con virus de la gripe A/PR/8/34 21 días después de la primera infección (principal). La magnitud de los títulos de anticuerpo aumentó después de la provocación con virus A/PR/8/34 (H1N1) como se ha mostrado antes. Con una dosis de 10 mg/ratón de OM-85 BV se observaron mayores niveles de títulos de anticuerpo de IH. En cambio, la dosis de 1 mg/ratón tenía menores títulos de anticuerpo que la dosis de 10 mg/ratón del fármaco.

10 Entre los grupos tratados y los controles no hubo diferencias significativas en el virus pulmonar detectado. Sin embargo, los síntomas clínicos después de una infección por aerosol con un virus de la gripe A/PR/8/34 patógeno para ratones en animales a los que se les había administrado una dosis de 10 mg de un extracto según la invención se presentaron al menos un día completo más tarde que en los controles, y el grupo experimental se recuperó también aparentemente antes que los ratones de control. No obstante, no hubo diferencias significativas en los resultados clínicos entre los grupos tratados con una dosis de 1 mg y los controles, lo que sugiere que el efecto del extracto dependía de la dosis. Tres días después de la primera infección no había diferencias significativas en los niveles de anticuerpo de inhibición de hemaglutinación por gripe entre los grupos tratados y los controles. Sin embargo, durante la segunda infección con virus de la gripe A/PR/8/34 tres semanas después de la primera infección, se observó una magnitud mayor y significativa de inducción de anticuerpos con el grupo que recibió una dosis de 10 mg/ratón.

20 Este ejemplo demuestra que un extracto según la invención en la dosis de 10 mg por ratón era capaz de conferir protección contra la infección por aerosol con virus de la gripe A/PR/8/34 (H1N1) patógeno para ratones según determinan múltiples parámetros. Por lo tanto, algunas realizaciones de la invención pueden activar *in vivo* una respuesta inmunitaria contra un virus. Dado que, en algunas realizaciones, los extractos pueden producirse exclusivamente a partir de bacterias patógenas, como lo fue el extracto ensayado en este ejemplo, esto sugiere que algunas realizaciones de la invención pueden activar el sistema inmunitario innato.

Ejemplo 7: Actividad de realizaciones de la invención en un ensayo de óxido nítrico múrido

25 Se dio muerte a ratones C57/BL6 machos de seis semanas de edad (machos de seis semanas de edad, calidad SPF, Charles Rivier, FR) por inhalación de CO<sub>2</sub>. Se extirparon la cadera, el fémur y la tibia de la extremidad posterior. Se extrajo la médula ósea de la luz inyectando Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DH) a través del hueso después de cortar ambas partes terminales. Después de un lavado, se resuspendieron las células madre (40.000 células/ml) en medio DH complementado con un 20 % de suero de caballo y un 30 % de sobrenadante celular L929. La suspensión celular se incubó durante 8 días en una incubadora a 37 °C bajo un 8 % de CO<sub>2</sub> y una atmósfera saturada de humedad. A continuación se separaron con PBS helado macrófagos, que se lavaron y se resuspendieron en medio DH complementado con un 5 % de suero fetal bovino (SFB), aminoácidos y antibióticos (medio DHE). La densidad celular se ajustó a 700.000 células/ml. Se diluyeron en serie en medio DHE, directamente en placas de microtitulación, soluciones acuosas de los productos. Los productos se ensayaron 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 a los productos diluidos 100 µl de la suspensión celular y se incubaron las células durante 22 h en una incubadora a 37 °C, bajo un 8 % de CO<sub>2</sub> y una atmósfera saturada de humedad. Al final del periodo de incubación se transfirieron 100 µl de sobrenadante a otra placa de microtitulación y se determinó la concentración de nitrito producida en cada sobrenadante llevando a cabo una reacción de Griess. Se añadieron a cada pocillo 100 µl de reactivo de Griess (5 mg/ml de sulfanilamida + 0,5 mg/ml de clorhidrato de N-(1-naftil)etileno-diamina) en ácido fosfórico acuoso al 2,5 %. Las placas de microtitulación se leyeron con un espectrofotómetro (SpectraMax Plus, Molecular Devices) a 562 nm contra una referencia a 690 nm. La concentración de nitrito era proporcional al contenido de óxido nítrico formado. El contenido de nitrito se determinó sobre la base de una curva estándar. Los

resultados se indicaron en óxido nítrico (NO)  $\mu\text{M}$  como valor medio  $\pm$  desviación estándar y se representaron gráficamente como una curva de dosis respuesta (véanse las Figuras 4-7).

Ejemplo 8: Ensayo cromógeno de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL)

5 Para determinar la presencia de moléculas de tipo endotoxina se llevó a cabo un ensayo LAL con el kit Chromogenic - LAL de Bio-Whittaker.

10 Este ensayo está basado en la activación de lipopolisacáridos (LPS) o productos de estructura comparable mediante una cascada enzimática presente en el LAL. Esta activación enzimática se demuestra mediante la separación de un cromógeno enlazado a un péptido por medio de una proteasa. La reacción enzimática se lleva a cabo a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  y la formación del cromógeno con el paso del tiempo se mide a  $405\text{ nm}$ . Se registra el tiempo necesario para alcanzar las 0,2 unidades de D.O. y se calcula la actividad endotóxica en relación con un estándar de LPS (curva estándar).

Los resultados de tal experimento ejemplar en extractos según la invención están expresados en la tabla siguiente en UE (unidades de endotoxina) en relación con una preparación estandarizada de LPS de *E. coli* (1 UE corresponde a  $0,09\text{ ng}$  de LPS equivalente).

Condiciones de lisis (tiempo de lisis, cantidad de material de partida, porcentaje inicial de NaOH)	UE/ml	ng LPS equivalente/ml
Hemo NaOH 1% 100 g/l / T 22h	169900 $\pm$ 600	15291
Hemo NaOH 1% 125 g/l / T 211h	2811000 $\pm$ 82644	252990
Hemo NaOH 1% 50 g/l / T 211h	33950 $\pm$ 224	3055
Hemo NaOH 1% 50 g/l / T 22h	> 5000000	450000
Hemo NaOH 1% 50 g/l / T 92h	> 500000	45000
Hemo NaOH 2% 25 g/l / T 92h	65430 $\pm$ 565	5888
Hemo NaOH 2% 50 g/l / T 211h	23560 $\pm$ 142	2120
Hemo NaOH 2% 50 g/l / T 22h	579200 $\pm$ 1062	52128
Hemo NaOH 2% 50 g/l / T 92h	7927 $\pm$ 320	713
Hemo NaOH 3% 125 g/l / T 211h	30000 $\pm$ 113	2700
Hemo NaOH 3% 25 g/l / T 22h	6883 $\pm$ 34	619
Hemo NaOH 3% 50 g/l / T 22h	10690 $\pm$ 41	962
Hemo NaOH 4% 100 g/l / T 92h	11380 $\pm$ 36	1024
Hemo NaOH 4% 12.5 g/l T 22h	3415 $\pm$ 40	307
Hemo NaOH 4% 12.5 g/l T 92h	10500 $\pm$ 37	945
Hemo NaOH 10% 100g/l T 92h	1229 $\pm$ 38	110
Hemo NaOH 10% 12.5 g/l / T 211h	224 $\pm$ 17	20
Hemo NaOH 10% 125 g/l / T211h	602 $\pm$ 6	54
Ejemplo 4	20140	1812
Ejemplo 3.15	108 $\pm$ 0.5	10
H <sub>2</sub> O	< 0.005	15291

Ejemplo 9: Inhibición de secreción de histamina

Se empleó un modelo de rata *in vitro* de degranulación de mastocitos (propuesto por el CRO CEREP, número de catálogo 2006: 771-c, ref Håkanson R, Rönnerberg AL, Sjölund K. *Anal Biochem*, 1972 jun 47(2):356-70) para investigar el modo en que una realización de la invención (que comprende 21 cepas bacterianas) inhibiría la secreción de histamina por mastocitos estimulados con compuesto 48/80. El protocolo y las condiciones experimentales están brevemente resumidos en las tablas siguientes:

Protocolo

Ensayo	Origen	Compuesto de referencia	Referencia
Secreción de histamina (estimulado con compuesto 48/80)	mastocitos de rata	SCG	Hakanson et al. (1972)

Condiciones experimentales

Ensayo	Estímulo	Incubación	Producto de reacción	Método de detección
Secreción de histamina (estimulado con compuesto 48/80)	Compuesto 48/80 (0,1 µg/ml)	2 min/37 °C	histamina	fluorimetría

Análisis y expresión de los resultados

Los resultados se expresan como porcentaje de la actividad específica de control: (actividad específica medida/actividad específica de control) x 100, obtenido en presencia de los compuestos de ensayo. Los valores CI<sub>50</sub> (concentración que produce la mitad de la inhibición máxima de la actividad específica de control) se determinaron mediante análisis de regresión no lineal de las curvas de inhibición generadas con valores medios repetitivos utilizando un ajuste de curvas de la ecuación de Hill ( $Y = D + [(A - D)/(1 + (C/C_{50})^{nH}]$ , donde Y = actividad específica, D = actividad específica mínima, A = actividad específica máxima, C = concentración de compuesto, C<sub>50</sub> = CI<sub>50</sub>, y nH = factor de pendiente). Este análisis se llevó a cabo utilizando software desarrollado en Cerep (Hill software) y validado mediante una comparación con datos generados por el software comercial SigmaPlot®4.0 para Windows® (© 1997 por SPSS Inc.).

En cada experimento, la referencia se ensayó simultáneamente con el extracto de ensayo con el fin de evaluar la idoneidad del ensayo. Se ensayaron varias concentraciones (para la determinación del valor CI<sub>50</sub>) y se compararon los datos con valores históricos determinados en Cerep. El ensayo se consideraba válido si se cumplían los criterios de idoneidad, de acuerdo con el procedimiento de operación estándar correspondiente. Los valores CI<sub>50</sub> determinados para el extracto de ensayo y la referencia (medidos dos veces) se indican en la tabla siguiente. Los valores CI<sub>50</sub> para la referencia estaban dentro de los límites aceptados del promedio histórico ± 0,5 unidades logarítmicas.

Las curvas de inhibición correspondientes obtenidas con el extracto de ensayo se muestran en la Figura 8.

Compuestos ensayados	CI <sub>50</sub>
Extracto de ensayo	0,0049 mg/ml
SCG (referencia 1)	4.7E-06 M
SCG (referencia 2)	1.1E-06 M

Los resultados indican que el extracto ensayado es un inhibidor potencial de la secreción de histamina inducida por mastocitos estimulados con compuesto 48/80.



Ejemplo 10: Efecto de una realización de la invención en un modelo de infección con *Escherichia coli* en una cepa de ratones no sensible a los LPS

Se ensayó una realización de la invención en un modelo *in vivo* reconocido de infecciones bacterianas con *E. coli* (véase Hopkins et al., Inheritance of susceptibility to induced *Escherichia coli* bladder and kidney infections in female C3H/HeJ mice., *J Infect Dis.* 2003 feb 1;187(3):418-23.). Se mutaron ratones C3H/HeJ para el gen receptor de tipo toll (TLR4), y éstos no son sensibles a agonistas de TLR4 tales como LPS. Por lo tanto, este modelo es adecuado para detectar los efectos de fármacos que actúen a través de vías que no sean TLR4.

Se trató un grupo de ratones C3H/HeJ hembras de 10-12 semanas de edad (8 ratones) por vía oral con un extracto según el Ejemplo 3.15 durante 10 días antes de la infección con *E. coli*.

Se mantuvo a los animales en condiciones normales, a una temperatura ambiente de 18-26 °C y una humedad relativa del 30 al 70 %. El programa de luz se ajustó a un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas.

Se alimentó a los animales con una dieta estándar proporcionada por los laboratorios Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN). Se proporcionó agua corriente *ad libitum*, salvo cuando se indique en otra parte.

Los animales tratados recibieron por vía oral 143 mg de liofilizado (es decir 25 mg (17,5 %) de extracto bacteriano y 118 mg (82,5 %) de excipientes) por animal por administración del extracto.

#### Inoculación

Se inoculó a ratones por vía intravesical PBS o *E. coli* uropatógena, según un protocolo de inóculo mínimo que reduce enormemente la probabilidad de inoculación asociada a un reflujo de los riñones e induce infecciones en todos los animales inoculados. En estos experimentos se utilizó la cepa de *E. coli* 1677, aislada de la orina de una mujer con una ITC febril. Para preparar el inóculo se cultivaron bacterias a partir de existencias congeladas mediante 2 pases en caldo triptosa (Difco Laboratories), se lavaron las bacterias con PBS y se resuspendieron las mismas hasta una concentración de  $2 \times 10^{10}$  bacterias/ml. Se privó a los ratones de agua durante 1 h y se extrajo la orina de sus vejigas inmediatamente antes de la inoculación. Se instilaron en la vejiga diez microlitros de inóculo bacteriano mediante cateterismo uretral, bajo anestesia con isoflurano, lo que tuvo como resultado una dosis de  $2 \times 10^8$  *E. coli* por ratón. Se dejó a los animales que se recuperasen de la anestesia y se les volvió a dar agua 1 h después.

Se dio muerte a los ratones 10 días después de la inoculación, para evaluar las intensidades de las infecciones de vejiga y riñón. Se extirparon, se pesaron y se homogeneizaron en PBS estéril la vejiga y ambos riñones de cada animal, después de lo cual se extendieron los homogeneizados en serie en placas sobre agar con eosina y azul de metileno de Levine (Difco Laboratories). El número de colonias de *E. coli* en cada placa se contó después de una incubación durante la noche a 37 °C y se utilizó para calcular el número total de bacterias en cada vejiga o par de riñones.

Para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de unidades formadoras de colonias (UFC) totales para diferentes grupos de ratones (PBS, grupo infectado no tratado y grupo tratado e infectado) se utilizó un ensayo de diferencia mínima significativa protegido de Fisher. Los datos sobre las infecciones de vejiga y riñón se transformaron utilizando UFC totales =  $\log_{10} [(UFC + 100)/\text{mg de tejido}]$ , donde UFC era el número total de unidades formadoras de colonias calculado por muestra de tejido.

Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 9a y 9b para la vejiga y los riñones, respectivamente. Los ratones fueron sacrificados 10 días después de la inoculación, para evaluar las intensidades de las infecciones de vejiga y riñón. Se extirparon, se pesaron y se homogeneizaron en PBS estéril la vejiga y ambos riñones de cada animal, después de lo cual se extendieron los homogeneizados en serie en placas sobre agar con eosina y azul de metileno de Levine (Difco Laboratories). El número de colonias de *E. coli* en cada placa se contó después de una incubación durante la noche a 37 °C, y después de la adición de 100 UFC a los resultados obtenidos la suma obtenida en cada caso se dividió por los mg de tejido (es decir UFC totales =  $\log_{10} [(CFU + 100)/\text{mg de tejido}]$ ) para calcular el número medio total de bacterias +/- EEM para vejigas o riñones. El extracto bacteriano disminuyó en un factor > 3 (vejiga) y > 2 (riñones) los valores logarítmicos obtenidos, lo que sugiere que el número de colonias cultivadas a partir de la vejiga y de los riñones había disminuido al menos en un factor de 1.000 y 100, respectivamente. Estos resultados demuestran la actividad inmunológica de una realización de la invención.

Ejemplo 11: Efecto de una realización de la invención en un modelo murino de infección con *Salmonella typhimurium* intraperitoneal en ratones C57/bl

Se ensayó también una realización de la invención en un modelo murino de infección con *Salmonella typhimurium* intraperitoneal. Se criaron ratones C57BL/6 durante 7 días antes de un tratamiento oral. Los animales tratados recibieron 85 mg de liofilizado (es decir 15 mg (17,5 %) de extracto bacteriano y 70 mg (82,5 %) de excipientes) por animal por administración. El experimento consistía en un grupo experimental de 20 ratones tratados con un extracto según el Ejemplo 3.15 y un grupo de control de 20 ratones tratados con un control de agua. Para el tratamiento, el extracto se disolvió diariamente en agua destilada con el fin de obtener una dosis individual 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 provocados por vía intraperitoneal con la cepa 415 de *Salmonella typhimurium* (Instituto de Vacunas y Sueros I. Mechnokov, Academia Rusa de Ciencias Médicas).

5 El extracto se introdujo en una dosis individual de 85 mg por ratón (es decir 15 mg de principio activo con un 82,5 % de excipientes). Los ratones del grupo de control recibieron un tratamiento simulado utilizando una administración oral de 0,5 ml de agua diariamente durante 10 días. Una provocación preliminar de determinación de dosis osciló entre 102 y 105 UFC de *Salmonella* por ratón. La dosis de 104 UFC se seleccionó para el experimento principal porque esta dosis proporcionaba aproximadamente un 50 % de supervivientes en animales no tratados.

10 Después de la provocación, se mantuvo a los ratones en las condiciones estándar para animales de laboratorio. Durante un periodo de 21 días después de la infección se llevaron a cabo una observación y registros diarios de muertes. La eficacia antiinfecciosa del extracto (véanse las tablas siguientes) se estimó de acuerdo con la tasa de supervivencia (TS) postinfección, y la duración media de vida (DMV) postinfección, y el factor de defensa (FD), y el índice de eficacia (IE) de la preparación, que se calcularon para cada grupo experimental. La TS se consideró como un porcentaje de animales vivos en el grupo experimental el día 21 después de la infección.

La DMV, el FD y el IE se calcularon utilizando las siguientes fórmulas:

15 
$$DMV = (X1 + X2 + \dots + Xn) : N,$$

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

$$FD = MC : ME,$$

20 donde FD es el factor de defensa, MC es un porcentaje de muerte en el grupo de control y ME es un porcentaje de muerte en el grupo experimental.

$$IE = [(FD - 1) : FD] \times 100 \%,$$

donde IE es el índice de eficacia de la preparación y FD es el factor de defensa.

Registros de muertes en grupo de control y grupo experimental durante el periodo de 21 días después de la infección con  $10^4$  UFC de *Salmonella typhimurium*.

Tratamiento previo	Nº de ratones antes de provocación	Número de ratones muertos desde el día 1 hasta el día 21 después de la infección																					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 <sub>2</sub> O	19	-	-	1	2	2	-	1	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	58	
Ejemplo 3.15	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	

Eficacia de defensa del Ejemplo 3.15 en el modelo de infección letal con *Salmonella thyphimurium* en ratones C57BL/6.

Tratamiento previo con sustancias	Tasa de mortalidad (%)	Tasa de supervivencia (%)	DMV (días)	FD	IE (%)
H <sub>2</sub> O	42	58	15,3	1	0
Ejemplo 3.15	0	100	21	Defensa máxima	100

Durante el experimento se hizo evidente que el extracto parecía tolerarse bien. En el grupo de control de ratones tratados previamente con agua, la tasa de supervivencia durante el periodo de observación (21 d) fue de un 58 % y la DMV fue de 15,3 días. En cambio, todos los ratones que recibieron el extracto según esta invención sobrevivieron a la provocación. Estos resultados sugieren que algunas realizaciones de la invención podrían ser beneficiosas contra ciertas infecciones bacterianas en seres humanos.

Ejemplo 12: Efecto de una realización de la invención en la producción de células T reguladoras en la mucosa de la tráquea durante una provocación con alérgeno

Se ensayó el potencial inmunorregulador de una realización de la invención en un modelo de inflamación alérgica aguda. El experimento se llevó a cabo para determinar si, en ratas PVG, la administración de un extracto según la invención aumentaría el tamaño del conjunto de células T reguladoras (Treg) con alojamiento preferencial en la mucosa disponibles, lo que resultaría en mayores números de Treg en tejidos de mucosa de las vías aéreas durante una inflamación episódica.

Se criaron ratas PVG consanguíneas y se mantuvieron éstas libres de patógenos comunes de las ratas. De principio a fin se utilizaron animales de ambos sexos de 8-13 semanas de edad seleccionados aleatoriamente.

Las alimentaciones diarias consecutivas (gavaje) se llevaron a cabo con 400 µg de liofilizado proporcionado/g de cuerpo (o 400 mg/kg/día). En los grupos de estudio se identificaron fenotípicamente poblaciones de Treg en tejido de las vías aéreas de ratas PVG. La caracterización fenotípica de tejido traqueal de rata requiere tamaños de grupo de 5 a 10 animales reunidos para producir suficientes células para los análisis. Los tejidos traqueales se digirieron en colagenasa/DNasa para producir suspensiones celulares individuales, a lo que siguieron análisis por citometría de flujo de la expresión superficial de CD4, CD25, Foxp3 y TCRαβ. En primer lugar, los animales fueron sensibilizados con OVA el día cero (d0) y alimentados con un extracto similar al del Ejemplo 3.15 o placebo desde el d10 hasta el d17; el d18 fueron provocados con OVA administrado por aerosol y 24 horas después se midió la respuesta de células Th/Treg (FoxP3) resultante. Para la tinción intracelular de Fox p3 se utilizó un kit de tinción FoxP3-FLR antirrátón/antirrata de eBioscience (San Diego, CA) según la descripción del fabricante. Los datos se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) y se analizaron utilizando software Flowjo (versión 4.6.1, Tree Star Inc). OVA procedía de Sigma Chemicals Co. (San Luis, Misuri).

Las Figuras 10a y 10b muestran datos de citometría de flujo originales (en la Fig. 10a los marcadores fueron CD14 versus FoxP3 y en la Fig. 10b los marcadores fueron TCR versus FoxP3). Las células se obtuvieron de mucosa de las vías aéreas en ratas sensibilizadas con OVA (i.p. el día 0) y 24 horas después de una provocación con OVA en aerosol (día 18). Los recuadros de la derecha en las Figuras 10a y 10b muestran que, cuando los animales recibieron el extracto por vía oral desde el día 10 hasta el día 18, hubo un porcentaje elevado de células CD4 (y TCR respectivamente) positivas para FoxP3 en comparación con los controles mostrados en los recuadros de la izquierda (animales no tratados sensibilizados con OVA y animales provocados con OVA).

Este ejemplo muestra que algunas realizaciones de la invención pueden tener valor terapéutico en caso de crisis alérgica inflamatoria.

Los ejemplos adicionales incluyen:

Un extracto de todas las especies bacterianas seleccionadas entre: *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus sanguinis*, en donde, durante la preparación de dicho extracto, se lisan las especies bacterianas en un pH mayor de 12 y se trata el extracto de manera que se eliminen ácidos nucleicos; y en donde el extracto no plantea un riesgo de enfermedades priónicas al administrarlo a un paciente. El extracto puede comprender además lisado bacteriano de cultivos seleccionados entre las siguientes especies: *Staphylococcus Hemolyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Neisseria sicca*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Actinobacillus (Hemophilus) actinomycetemcomitans* y *Eikenella corrodens*.

El extracto del párrafo anterior obtenido de al menos una cepa de todas las especies bacterianas siguientes:

*Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus sanguinis*.

Las cepas de las especies bacterianas anteriores pueden seleccionarse entre las cepas bacterianas siguientes: *Moraxella (Moraxella) catarrhalis* 3622, *Moraxella (Moraxella) catarrhalis* 3625, *Moraxella (Moraxella) catarrhalis* I-045, *Haemophilus influenzae* 8467, *Klebsiella pneumoniae ssp. ozaenae* 5050, *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae* 204, *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae* 5056, *Staphylococcus aureus* I-049, *Staphylococcus aureus* I-050, *Staphylococcus aureus* I-051, *Staphylococcus aureus* I-052, *Staphylococcus aureus* I-053, *Staphylococcus aureus* I-054, *Streptococcus pneumoniae* 7465, *Streptococcus pneumoniae* 7466, *Streptococcus pneumoniae* 7978, *Streptococcus pneumoniae* 10319, *Streptococcus pyogenes* 8191, *Streptococcus sanguinis* I-046, *Streptococcus sanguinis* I-047, *Streptococcus sanguinis* I-048, *Staphylococcus Hemolyticus* 11042, *Enterococcus faecalis* 103015, *Streptococcus mutans* 10449, *Streptococcus anginosus* 10713, *Streptococcus mitis* 12261, *Streptococcus salivarius* 102503, *Neisseria sicca* 103345, *Haemophilus parainfluenzae* 7857, *Actinobacillus (Hemophilus) actinomycetemcomitans* 52.105 y *Eikenella corrodens* 10596.

El extracto de cualquiera de los tres párrafos precedentes, comprendiendo el extracto menos de 100 µg/ml de ácido nucleico.

El extracto de cualquiera de los tres párrafos precedentes, comprendiendo el extracto al menos 0,3 mg/ml de sacáridos.

El extracto de cualquiera de los tres párrafos precedentes, comprendiendo el extracto entre 0,3 y 4,5 mg/ml de sacáridos.

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

El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, comprendiendo el extracto entre 1,5 y 2,5 mg/ml de aminoácidos libres.

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

El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, tratándose el extracto de manera que se eliminan componentes particulados y/o insolubles.

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

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

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

El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde los aminoácidos libres del extracto comprenden entre un 10 y un 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.

El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, comprendiendo el extracto al menos un D-aminoácido seleccionado 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 un 1 y un 50 % de la concentración de aminoácidos libres.

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

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

El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, comprendiendo el extracto entre 6 y 75 mg/ml de una o más

proteínas.

El extracto del párrafo precedente, comprendiendo el extracto entre 6 y 8 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.

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

El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, siendo de al menos un 70 % la tasa de supervivencia de al menos 8 ratones con sensibilidad a LPS de tipo silvestre 13 días después de una provocación con *Salmonella thyphimurium*, eligiéndose la dosis de *Salmonella thyphimurium* de tal manera que la tasa de supervivencia de al menos 8 ratones de control sea de un 60 % o menos.

El extracto del párrafo precedente, siendo la tasa de supervivencia de al menos un 80 %.

El extracto del párrafo precedente, siendo la tasa de supervivencia de al menos un 90 %.

El extracto de cualquiera de los párrafos precedentes, comprendiendo el extracto menos de 5.000 ng de equivalentes de LPS según un ensayo cromógeno de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL).

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

Un método para tratar a un individuo que padece o presenta riesgo de desarrollar un trastorno respiratorio, que comprende administrar una cantidad eficaz de cualquiera de los extractos de los párrafos anteriores a dicho individuo.

El método del párrafo anterior, en donde el individuo es un humano o un mamífero doméstico.

El método de cualquiera de los dos párrafos precedentes, en donde el trastorno respiratorio o el estado alérgico es infecciones de las vías respiratorias superiores e inferiores, dermatitis atópica, nasofaringitis, sinusitis, faringitis, amigdalitis, laringitis, traqueítis, laringofaringitis, gripe, neumonía, bronconeumonía, bronquitis, infecciones de las vías respiratorias inferiores, rinitis alérgica, asma alérgica, rinitis, nasofaringitis, faringitis, sinusitis, amigdalitis, laringitis, laringotraqueítis, bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva con infección aguda de las vías respiratorias inferiores, o enfermedad pulmonar obstructiva con exacerbación aguda.

Un procedimiento para preparar un extracto a partir de una mezcla de todas las especies bacterianas seleccionadas entre: *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus sanguinis*, que comprende:

(a) cultivar cada especie bacteriana en un medio que no plantee un riesgo de enfermedades priónicas;

(b) lisar cada especie bacteriana en un pH inicial mayor de 12; y

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

El procedimiento del párrafo precedente, en donde el extracto se obtiene de al menos una cepa de todas las especies bacterianas siguientes: *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus sanguinis*.

El procedimiento del párrafo precedente, en donde las cepas bacterianas pueden seleccionarse entre las cepas bacterianas siguientes: *Moraxella (Moraxella) catarrhalis* 3622, *Moraxella (Moraxella) catarrhalis* 3625, *Moraxella (Moraxella) catarrhalis* I-045, *Haemophilus influenzae* 8467, *Klebsiella pneumoniae ssp. ozaenae* 5050, *Klebsiella pneumoniae* 204, *Klebsiella pneumoniae* 5056, *Staphylococcus aureus* I-049, *Staphylococcus aureus* I-050, *Staphylococcus aureus* I-051, *Staphylococcus aureus* I-052, *Staphylococcus aureus* I-053, *Staphylococcus aureus* I-054, *Streptococcus pneumoniae* 7465, *Streptococcus pneumoniae* 7466, *Streptococcus pneumoniae* 7978, *Streptococcus pneumoniae* 10319, *Streptococcus pyogenes* 8191, *Streptococcus sanguinis* I-046, *Streptococcus sanguinis* I-047, *Streptococcus sanguinis* I-048. El procedimiento de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde la lisis se lleva a cabo en un pH inicial de más de 12,5.

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

El procedimiento de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde la lisis se lleva a cabo durante un periodo de 40 horas a 10 días a una temperatura de 30-60 °C.

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

El procedimiento de cualquiera de los párrafos precedentes, en donde la parte (c) comprende una filtración de flujo tangencial.

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

El procedimiento de cualquiera de los párrafos precedentes, que además comprende pasar el producto de (c) a través de un segundo microfiltro en 0,2 micras.

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

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

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

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

Un método para tratar a un individuo que padece o presenta riesgo de desarrollar un trastorno respiratorio, que comprende administrar una cantidad eficaz de cualquiera de los productos de uno cualquiera de los procedimientos de los párrafos anteriores a dicho individuo.

El método del párrafo precedente, en donde el individuo es un humano o un mamífero doméstico.

## REIVINDICACIONES

1. Un extracto de todas las especies bacterianas seleccionadas entre: *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus sanguinis*, que puede obtenerse lisando las especies bacterianas en un pH inicial mayor de 12, comprendiendo dicho extracto menos de 100 µg/ml de ácidos nucleicos, al menos 0,3 mg/ml de sacáridos, y no planteando el extracto ningún riesgo de enfermedades priónicas.
2. El extracto según la reivindicación 1, en donde el intervalo de dichos sacáridos está entre 0,3 mg-4,5 mg/ml, o 0,3-4 mg/ml, o 0,4-4 mg/ml, o 0,5-3,5 mg/ml, o 0,6-3 mg/ml, o 0,3-1 mg/ml.
3. El extracto según la reivindicación 1 o 2, en donde al menos un sacárido está seleccionado entre monosacáridos, disacáridos, polisacáridos y lipopolisacáridos (LPS).
4. El extracto según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la lisis se lleva a cabo en un pH inicial de 12,6 a 13,4.
5. El extracto según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo dicho extracto entre 5-75 mg/ml, 10-65 mg/ml, o 20-45 mg/ml, o 5-20 mg/ml, o 5-10 mg/ml, o 6-8 mg/ml de proteínas, teniendo una o más de dichas proteínas pesos moleculares de menos de 30 kDa.
6. El extracto según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo dicho extracto entre un 1-80 %, o un 10-45 %, o un 25-35 % de D-aminoácidos.
7. El extracto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo dicho extracto entre 1,5 y 2,5 mg/ml de aminoácidos en equivalentes de ácido glutámico (147,1 g/mol).
8. El extracto según la reivindicación 7, comprendiendo dicho extracto de 2 a 2,5 mg/ml o de 1,5 a 2 mg/ml de aminoácidos en equivalentes de ácido glutámico (147,1 g/mol).
9. El extracto según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende de 6 a 8 mg/ml de proteínas, de 1,5 a 2,5 mg/ml de aminoácido libre en equivalentes de ácido glutámico (147,1 g/mol) y de 0,4 a 0,5 mg/ml de polisacáridos y monosacáridos.
10. El extracto según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las cepas de dichas especies bacterianas están seleccionadas entre las cepas siguientes: *Moraxella catarrhalis* 3622, *Moraxella catarrhalis* 3625, *Moraxella catarrhalis* I-045, *Haemophilus influenzae* 8467, *Klebsiella pneumoniae ssp. ozaenae* 5050, *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae* 204, *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae* 5056, *Staphylococcus aureus* I-049, *Staphylococcus aureus* I-050, *Staphylococcus aureus* I-051, *Staphylococcus aureus* I-052, *Staphylococcus aureus* I-053, *Staphylococcus aureus* I-054, *Streptococcus pneumoniae* 7465, *Streptococcus pneumoniae* 7466, *Streptococcus pneumoniae* 7978, *Streptococcus pneumoniae* 10319, *Streptococcus pyogenes* 8191, *Streptococcus sanguinis* I-046, *Streptococcus sanguinis* I-047 y *Streptococcus sanguinis* I-048.
11. El extracto según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un extracto soluble.
12. Una composición farmacéutica que comprende el extracto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
13. El extracto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para el uso en un método de tratamiento y/o prevención de un trastorno respiratorio o estado alérgico en un individuo.
14. El extracto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para el uso en un método de protección contra un trastorno respiratorio o estado alérgico en un individuo que presente riesgo de desarrollar un trastorno respiratorio o estado alérgico.
15. El extracto para el uso en un método según la reivindicación 13 o 14, en donde el trastorno respiratorio o estado alérgico está seleccionado entre infecciones de las vías respiratorias superiores e inferiores, dermatitis atópica, nasofaringitis, sinusitis, faringitis, amigdalitis, laringitis, traqueítis, laringofaringitis, gripe, neumonía, bronconeumonía, bronquitis, infecciones de las vías respiratorias inferiores, rinitis alérgica, asma alérgica, asma, rinitis, nasofaringitis, faringitis, sinusitis, amigdalitis, laringitis, laringotraqueítis, bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva con infección aguda de las vías respiratorias inferiores, y enfermedad pulmonar obstructiva con exacerbación aguda.
16. El extracto para el uso en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 13-14, en donde el individuo es un humano o un mamífero doméstico.
17. Un procedimiento para preparar un extracto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 a partir de una mezcla de todas las especies bacterianas seleccionadas entre: *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y



*Streptococcus sanguinis*, que comprende:

(a) cultivar cada una de dichas especies bacterianas en un medio que no plantee un riesgo de enfermedades priónicas;

(b) lisar cada una de dichas especies bacterianas en un pH inicial mayor de 12; y

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

18. El procedimiento según la reivindicación 17, en donde la lisis se lleva a cabo durante un periodo de 40 horas a 10 días a una temperatura de 30 a 60 °C.

19. El procedimiento según la reivindicación 17, en donde la lisis se lleva a cabo durante un periodo de 20 a 240 horas a una temperatura de 30 a 40 °C.

20. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 17-19, en donde la lisis se lleva a cabo en un pH inicial mayor de 12,5.

21. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 17-20, en donde la lisis se lleva a cabo en un pH inicial de 12,6 a 13,4.

22. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 17-21, en donde el microfiltro es de 0,45 micras y el ultrafiltro es de 30 kDa.

23. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 17-22, en donde la parte (c) comprende una filtración de flujo tangencial.

24. El procedimiento según la reivindicación 23, en donde la filtración de flujo tangencial se lleva a cabo durante 5 a 15 ciclos.

25. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 17-24, que además comprende pasar el producto de (c) a través de un segundo microfiltro de 0,2 micras.

26. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 17-25, en donde la parte (b) se lleva a cabo con 5-120 g/l de peso en seco bacteriano de material.

27. El procedimiento según la reivindicación 26, en donde la parte (b) se lleva a cabo con 5-90 g/l de peso en seco bacteriano de material.



Figura 2/10

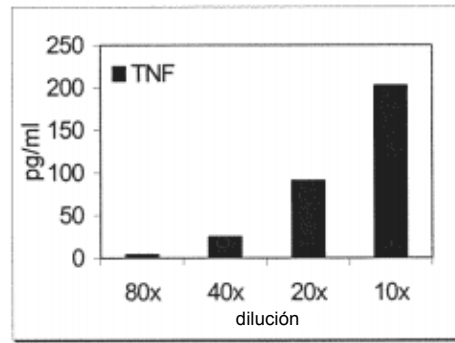
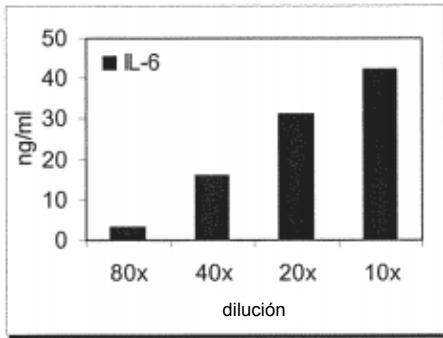


Figura 3/10

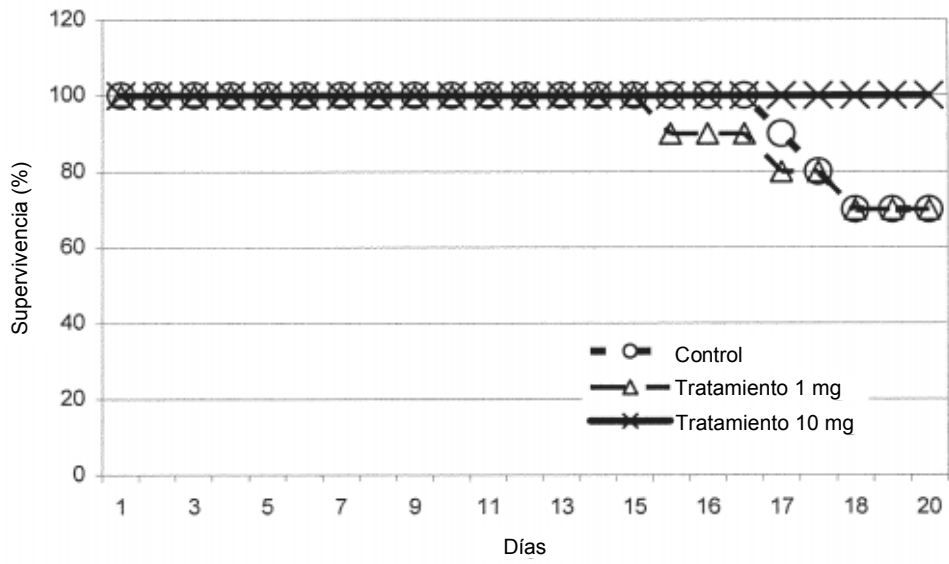


Figura 4/10

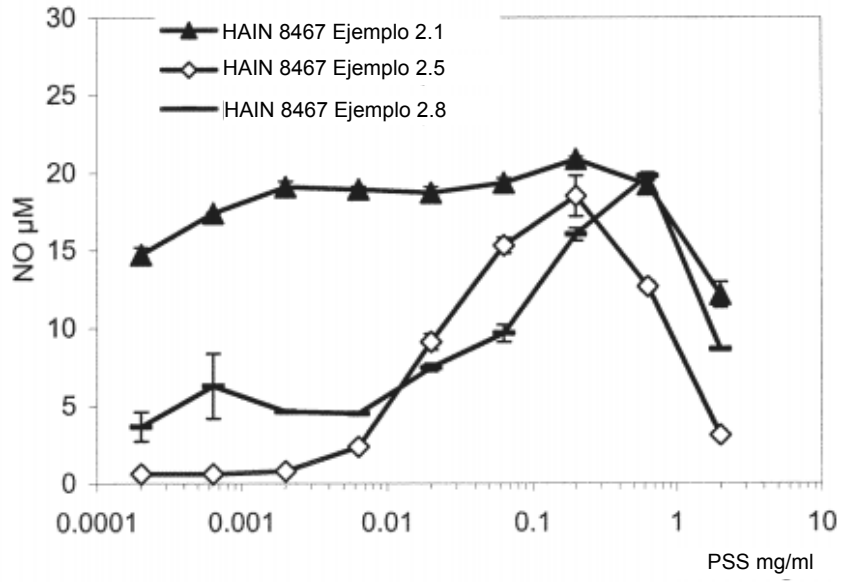


Figura 5/10

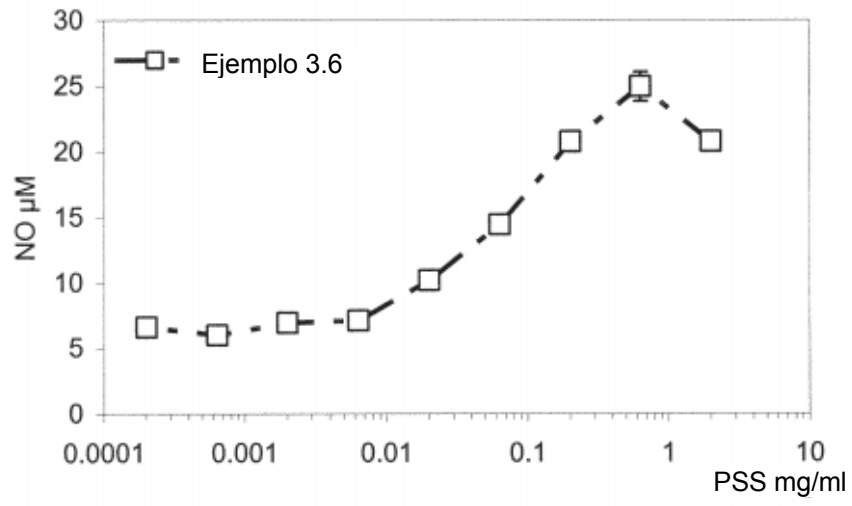


Figura 6/10

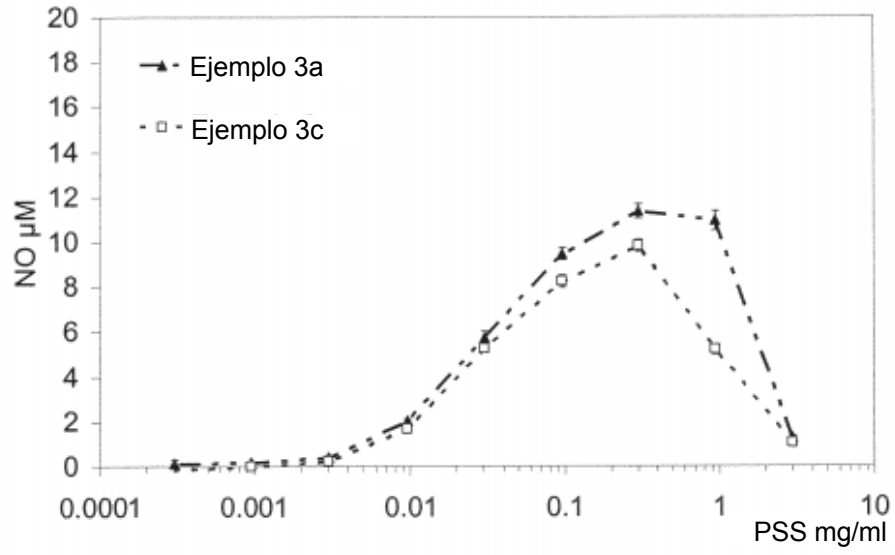


Figura 7/10

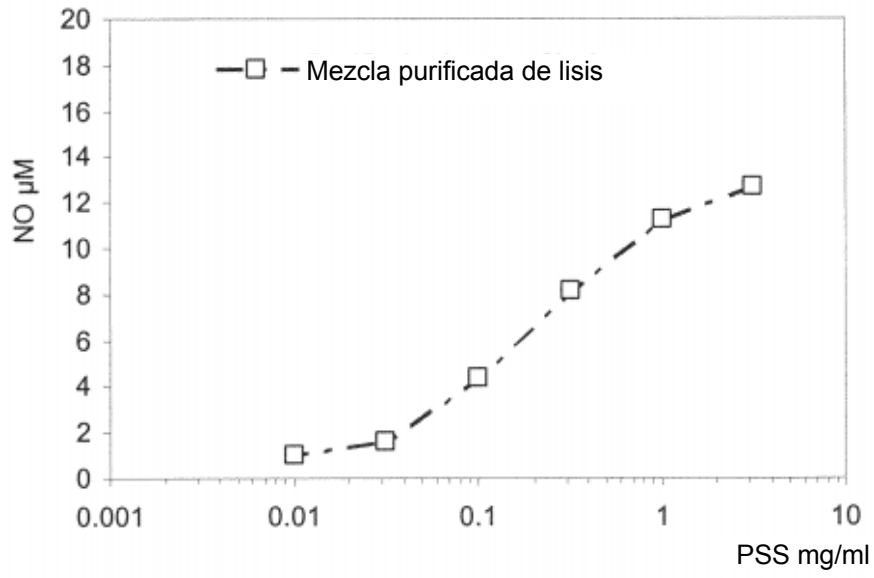
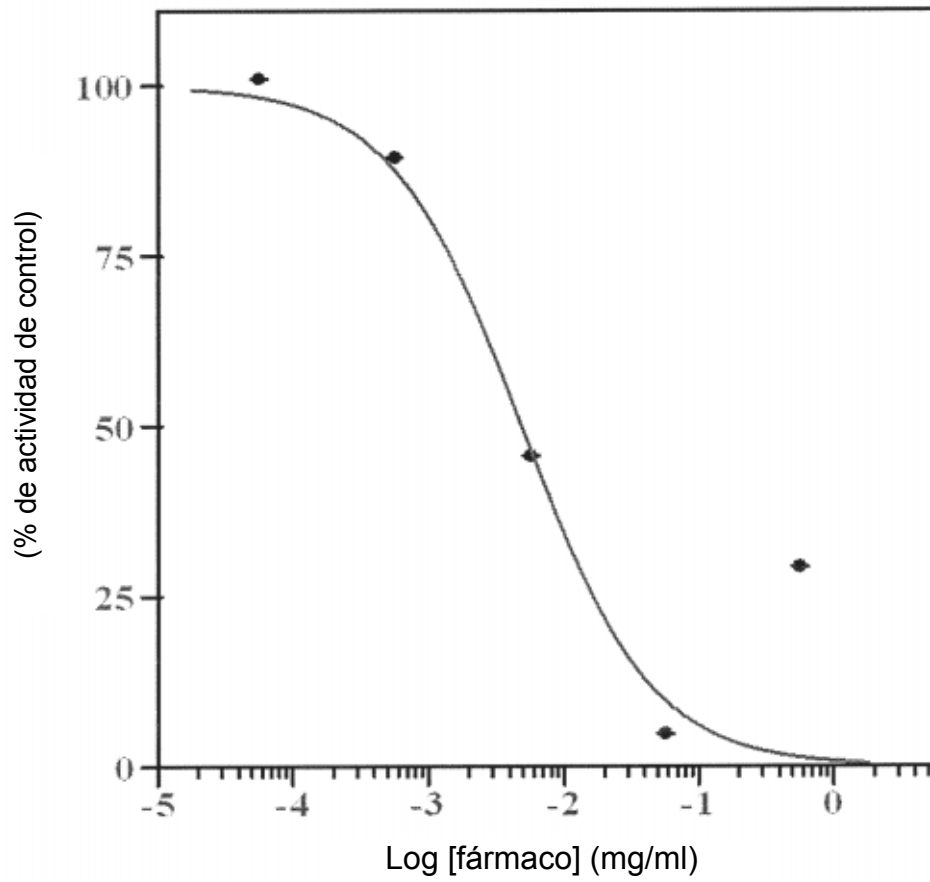




Figura 8/10

CI50 = 0,0049 mg/ml



**Figura 9/10**

Figura 9a

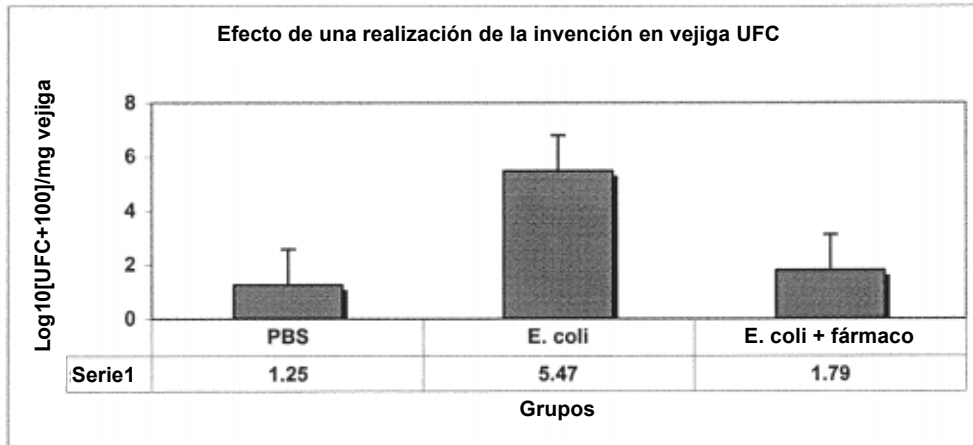
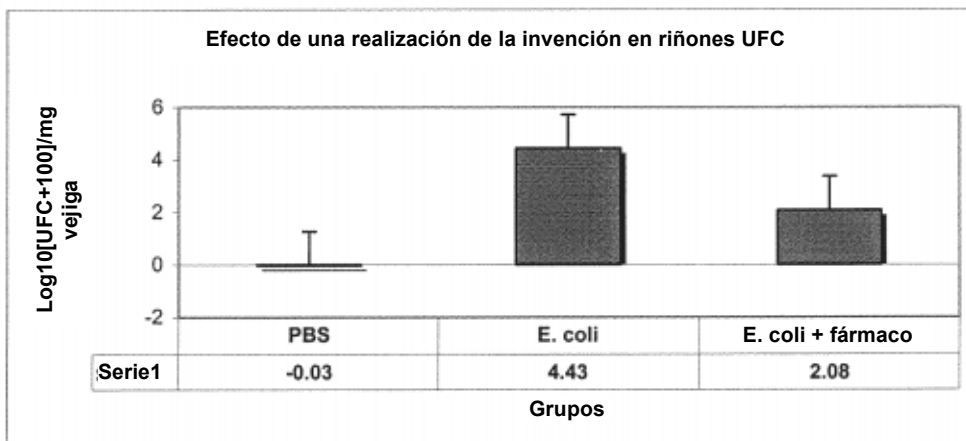


Figura 9b



**Figura 10/10**

Figura 10a

CD4 v Foxp3

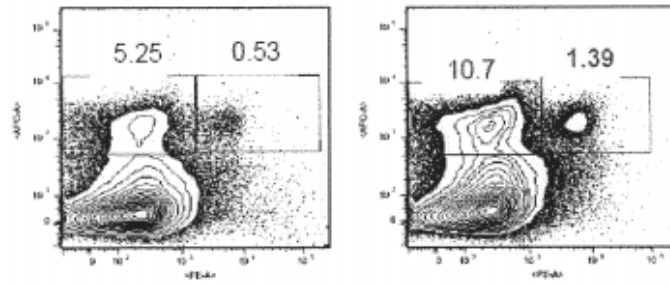


Figura 10b

TCR v Foxp3

