

203451

P - 9.985.-  
Nº 62.523-Case 13.135

203451



10 MAY. 1952

MEMORIA DESCRIPTIVA  
para solicitar  
P A T E N T E D E I N V E N C I O N  
E N  
E S P A Ñ A  
por VEINTE años

a nombre de AMERICAN CYANAMID COMPANY, entidad norteamericana,  
establecida en 30, Rockefeller Plaza, Nueva York, Estados,  
Unidos de América, por:

" MEJORAS INTRODUCIDAS EN LA PREPARACION DE  
UN MEDIO DE FERMENTACION ADECUADO PARA EL CULTIVO DE BAC-  
TERIAS PRODUCTORAS DE ESTREPTOKINASA Y ESTREPTODORNASA ".-

-----

Este invento se refiere a la producción de  
estreptokinasa y estreptodornasa por fermentación.

En años recientes se ha desarrollado un inte-  
rés considerable en la lisis de ciertos materiales con ayuda  
de enzimas. Entre las enzimas que reciben la máxima atención

5



203451

figuran la estreptokinasa y la estreptodornasa. La estreptokinasa actúa indirectamente sobre un substrato de fibrina o fibronógeno por activación de una enzima fibrinolítica en el suero humano que puede escindir la fibrina en fragmentos menores y causar así una rápida disolución de los coagulos sanguíneos y de los exudados fibrinosos. La estreptodornasa actúa directamente sobre un substrato de desoxiribonucleoproteína y ácido desoxiribonucleico, que son los constituyentes principales en los núcleos y constituyen del 30 al 70% del sedimento de los exudados purulentos. La estreptodornasa escinde la núcleo-proteína en bases purínicas libres y nucleótidos pirimidínicos y, así, determina una marcada caída en la viscosidad de los exudados purulentos.

A causa de las mencionadas propiedades, las mezclas de estreptokinasa y estreptodornasa han demostrado ser útiles en el tratamiento experimental de ciertas quemaduras, en el drenaje de senos purulentos, en el tratamiento de accesos óseos infectados crónicos u osteomielitis, en el drenaje de sangre coagulada procedente de heridas internas, y en el drenaje del bloqueo de la espina dorsal que ocurre en diversos tipos de meningitis. Con más generalidad las mezclas de estas dos enzimas son útiles en el tratamiento de empiema, hemotorax, hematoma e infecciones supurantes crónicas.

El empleo de estreptodornasa y estreptokinasa ha sido hasta ahora limitado en gran medida primordialmente a los ensayos experimentales porque estos compuestos no están todavía comercialmente disponibles. Incluso aunque el primer uso de estos dos compuestos, de que se haya informado, es tan



203451

antiguo como de 1.933, con anterioridad a este invento no se  
había desarrollado un método comercial para producirlo. Los  
solicitantes han desarrollado un método de producir mezclas  
de estreptokinasa y estreptodornasa por medio del cual pueden  
5 prepararse estas enzimas con sus muchas propiedades deseables  
en escala comercial para uso general.

En la medida que conocemos, el único método  
práctico de producir estreptokinasa y estreptodornasa es por  
el cultivo en un medio de fermentación de ciertas cepas de  
10 streptococci beta hemolíticos. Los estreptococos más frecuen-  
temente empleados son los de los grupos de Lancefield A, C "  
"humano", y G, prefiriéndose la cepa C. Se han ensayado mu-  
chos medios de fermentación y se ha informado en la biblio-  
grafía de los resultados de la fermentación en tales medios.  
15 El criterio entre las autoridades en este campo como se ha  
indicado por los informes bibliográficos, es que los medios  
más deseables para la fermentación de organismos productores  
de estreptoxinasa-estreptodornasa, comprenden una mezcla  
acuosa de materiales proteínicos animales parcialmente hidro-  
20 lizados, por ejemplo, productos parcialmente hidrolizados de  
la sangre y similares. Aún cuando los medios de fermentación  
que comprenden materiales proteínicos animales hidrolizados,  
tales como los citados, producen resultados bastante buenos  
en operación en pequeña escala, por ejemplo, cuando la ferro-  
25 mentación se lleva a cabo en recipientes de 30 litros, se ha  
comprobado que tales medios no pueden usarse convenientemente  
para dar resultados satisfactorios en gran escala, por ejem-  
plo fermentaciones de 400 litros. Cuando tales medios se

10 MAY



203451

emplean en una producción intentada en gran escala de mezclas de estreptokinasa y estreptodornasa, los estreptococos forman cantidades correspondientemente mucho menores de las enzimas. Como únicamente por producción en gran escala comercial es como pueden nacerse generalmente disponibles los beneficios de la estreptokinasa y estreptodornasa, es evidente-  
5 que un medio de fermentación que fuera adecuado para la producción comercial sería muy deseable y representaría un adelanto en la técnica.

10 De acuerdo con el invento se crea un medio de fermentación, adecuado para el cultivo de bacterias productoras de estreptokinasa y estreptodornasa que comprende un medio nutricio que contiene caseína hidrolizada por enzima, glicerina y un agente reductor de sulfhidrilo. Por el uso de  
15 tales medios de fermentación se ha comprobado que es posible producir mezclas de estreptokinasa y estreptodornasa en escala comercial por vez primera. Muchas fermentaciones que producen mezclas de estreptokinasa y estreptodornasa y que emplean estos nuevos medios de fermentación se han realizado  
20 en depósitos de más de 400 litros e incluso de más de 4.000 litros con resultados muy satisfactorios.

25 La caseína hidrolizada es el ingrediente primordial en el nuevo medio de fermentación y tiene como finalidad proporcionar el nitrógeno basal. Puede usarse cualquiera de los productos digeridos de caseína hidrolizada por enzima comercialmente disponibles. Un producto digerido de caseína comercialmente disponible muy satisfactorio y que se ha empleado en muchos de los experimentos del solicitante es



203451

5 producido por Sherfield Farms Company, Inc., de Nueva York, y se vende bajo la marca "N-Z-Amine". Estos productos digeridos son producidos formando una dispersión acuosa de caseína y añadiéndole jugos pancreáticos para catalizar la hidrólisis. En la bibliografía técnica, por ejemplo en las patentes norteamericanas números 2.489.880 y 2.180.637 pueden verse procedimientos detallados para preparar productos digeridos de caseína enzimáticamente hidrolizados.

10 Aún cuando la caseína hidrolizada constituye la parte importante de los nuevos medios de fermentación son también necesarios otros dos ingredientes, glicina y un agente reductor orgánico de sulfhidrilo. La cantidad de glicina empleada al preparar los nuevos medios de fermentación puede variar dentro de amplios límites, por ejemplo, de 1 a 15 350 partes en peso de glicina por cada 1.000 partes en peso de producto de caseína digerido. La cantidad óptima ha resultado ser de aproximadamente 100 a 200 partes de glicina por cada 1.000 partes de producto de caseína digerido. La cantidad de agente reductor orgánico de sulfhidrilo empleado 20 en la mezcla de fermentación puede variarse también dentro de amplios límites, por ejemplo, desde 0,01 a 0,5 peso molecular (moles si el peso del producto de caseína digerido está en gramos) de agente reductor de sulfhidrilo por 1.000 partes en peso de producto de caseína digerido. La relación 25 óptima ha resultado ser de 0,03 a 0,07 peso molecular por 1.000 partes en peso de producto de caseína digerido. La finalidad del agente reductor es simplemente mantener el medio en forma reducida y puede emplearse cualquiera de los

10 M



203451

bien conocidos agentes reductores de sulfhidrilo.

El hecho de que los medios de fermentación comprendan un producto de caseína enzimáticamente hidrolizado, glicina y un agente reductor de sulfhidrilo produzcan resultados tan superiores es efectivamente sorprendente. Esto es particularmente cierto en vista del hecho de que los medios que comprenden productos digeridos de caseína hidrolizados por ácido se han ensayado en la producción de mezclas de estreptokinasa y de estreptodornasa y han resultado fracasar por completo en la mayoría de los casos. Aún cuando no se comprenden plenamente las razones de esta sorprendente superioridad, no obstante, el hecho es que solamente por medio de un agente de fermentación que comprende caseína hidrolizada por enzima, glicina y un agente reductor de sulfhidrilo, ha sido posible producir estreptokinasa y estreptodornasa en escala comercial.

La ventaja primordial de los nuevos medios de fermentación de este invento son los rendimientos incrementados que pueden obtenerse en producción en gran escala, porque hasta ahora ha sido imposible obtener en la producción en gran escala rendimientos suficiente de enzimas, de modo que pudiera prepararse un material clínicamente aceptable. Los nuevos medios de fermentación de este invento dan en general en la producción en gran escala, por ejemplo, fermentación en depósitos de más de 400 litros, rendimientos de estreptokinasa, por parte en volumen, de casi tres veces los que se obtenían desde un medio de fermentación que comprendía un producto digerido de proteína animal, tal como uno



203451

preparado a partir de proteínas de la sangre. De hecho, las fermentaciones en medios que comprenden un producto de caseína digerido enzimáticamente hidrolizado, glicina y un agente reductor de sulfhidrilo, dan en general en fermentaciones en depósitos de 400 litros rendimientos de casi dos veces tantas unidades de actividad en estreptokinasa por parte en volumen de medio que las fermentaciones en un medio que comprenda un tipo de proteína animal de material en recipientes de 30 litros. En otros términos, incluso en escala comercial un medio que comprenda un producto de caseína digerido enzimáticamente hidrolizado, glicina y un agente reductor de sulfhidrilo da resultados mucho mejores que un medio que comprenda un producto digerido de proteína animal en condiciones óptimas.

Aún cuando las ventajas de los nuevos medios de fermentación no son tan fácilmente evidentes en la producción en pequeña escala porque los medios que comprenden un producto digerido de proteína animal dan casi rendimientos equivalentes de actividad por unidad de nitrógeno basal en estas circunstancias, los nuevos medios de fermentación de este invento tienen efectivamente ventajas incluso en la producción en pequeña escala. Esto se verá más claramente por los párrafos siguientes que describen ventajas adicionales de los nuevos medios de fermentación de este invento, cuyas ventajas son aplicables tanto en grande como en pequeña escala.

Además de la ventaja de mayores rendimientos de enzimas cuando se emplea un medio de fermentación que comprende un producto digerido de caseína, se obtienen otras



1952

203451

ventajas. Por ejemplo, un medio de fermentación que comprende un producto de caseína digerido se prepara más fácilmente que uno que emplee un producto digerido de proteína animal, tal como uno preparado a partir de sangre. El producto de caseína digerido es más fácil de manejar, de esterilizar y de dispersar. Esto da como resultado un coste muy reducido al preparar los medios de fermentación. Además, el coste original del producto digerido de caseína enzimáticamente hidrolizado es generalmente menor.

Los productos digeridos de proteína animal que están comercialmente disponibles contienen muchas sustancias proteínicas que son aproximadamente del mismo peso molecular y constitución que las enzimas deseadas estreptokinasa y estreptodornasa. Estos materiales proteínicos son precipitados por los mismos procedimientos de que se dispone para la precipitación de las enzimas deseadas y también tienen propiedades electroforéticas similares. Esto conduce a dificultades mucho mayores para obtener y purificar la estreptokinasa y la estreptodornasa, así como a un aumento en las cantidades necesarias de reactivos. Estas dificultades son intensificadas por los menores rendimientos que pueden obtenerse en un medio de fermentación que comprenda un producto digerido de proteína animal. Como se ha mencionado antes, se ha comprobado que es imposible, por los métodos de purificación de que se ha informado en las técnicas o incluso por los métodos mejorados desarrollados en relación con este trabajo obtener un producto de pureza suficiente para uso clínico a partir de fermentaciones de 400 litros empleando un agente que comprenda un producto



203451

digerido de proteina animal, tal como uno preparado a partir de sangre.

5 La tabla siguiente da la pureza de estreptokina-  
 10 nasa que ha sido posible obtener en condiciones equivalentes  
 a partir de un medio que comprende un producto digerido de  
 proteina animal tipico en comparacion con un medio que com-  
 prende un producto digerido tipico de caseina enzimaticamente  
 hidrolizada. El producto digerido de proteina animal empleado  
 fue un preparado comercial manufacturado por Difco Laborato-  
 15 rios de Detroit, Michigan, EE.UU., y vendido bajo la marca  
 "Neopeptone". La "Neopeptone" ha sido muy recomendada por  
 diversos articulos en la produccion de estreptokinasa y estrep-  
 todornasa como fuente de nitrogeno basal. La caseina enzi-  
 maticamente hidrolizada empleada fue tambien un material co-  
 mercial vendido por Sheffield Farms Company, Inc., de Nueva  
 York, bajo la marca de "N-Z-Amine". La pureza es dada en  
 unidades de estreptokinasa por gamma de nitrogeno total.

T A B L A I.

20

P U R E Z A

Medio	30 litros	400 litros
"Neopeptone"	12 u/gamma ±	10 u/ gamma ±
"N-Z-Amine"	100 u/gamma ±	100 u/ gamma ±

25 Se vera aso que por el uso de un medio que  
 comprende un producto digerido de caseina enzimaticamente  
 hidrolizada es posible obtener un producto que es aproxima-  
 damente 10 veces mas puro que el obtenido por los metodos de  
 la tecnica anterior.



203451

Además de un producto de caseína enzimáticamente hidrolizada, glicina y un agente reductor de sulfhidrilo pueden añadirse a menudo ventajosamente otros varios ingredientes al medio de fermentación. Estos agentes adicionales se denominan "ingredientes favorecedores del crecimiento" e incluyen tales materias como vitaminas, minerales, aminoácidos y elementos traza. La tabla siguiente detalla varios de estos materiales así como cantidades recomendadas que son a menudo ventajosas.

T A B L A II.

	<u>Favorecedor del crecimiento.</u>	<u>Partes en peso por cada 1.000 partes de producto digerido de caseína.</u>
15	$KH_2PO_4$	80 - 160
	$KHCO_3$	50 - 100
	Uracilo	0,2 - 0,6
	Sulfato de Adenina	0,2 - 0,6
	Acido nicotínico	0,02 - 0,08
20	Piridoxina	0,03 - 0,07
	Triptofana	0,4 - 1
	Pantotenato de calcio	0,1 - 0,3
	Hidrocloruro de tiamina	0,05 - 0,15
	Riboflavina	0,01 - 0,03
25	Cistina	2 - 6

Los elementos traza se añaden usualmente en forma de una mezcla de sales para dar cantidades pequeñísimas de los iones de metales tales como hierro magnesio, cobre,



1952

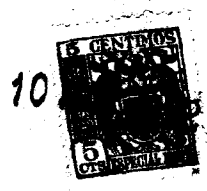
203451

zinc, etc. A menudo resultará conveniente preparar una "mezcla" de sales de las sales de metales tales como los citados y añadir una pequeña cantidad de la mezcla a cada fermentación. La tabla siguiente da la composición de una mezcla de sales que ha resultado ser satisfactoria cuando se emplea en cantidades de 40 a 150 mls. por Kg. de producto de caseína digerido.

T A B L A III.

<u>Material</u>	<u>Cantidad</u>
MgSO <sub>4</sub>	11,5 Kg.
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,05 kg.
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05 kg.
MnCl <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,02 kg.
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05 kg.
HCl	1,0 litro
Agua c.s. para dar	100 litros

La tabla siguiente muestra los resultados de fermentaciones con una cepa productora de estreptokinasa-estreptodornasa de estreptococos hemolíticos, primero con un medio de fermentación que comprende "N-Z-Amina" y. luego, en un medio de fermentación que comprende "Neopeptone". Los dos medios se formularon de modo que fuera la misma en ambos la concentración en nitrógeno basal y estuvieran presentes cantidades iguales de diversas sustancias favorecedoras del crecimiento en todos los casos. Los resultados se dan en la tabla para fermentación tanto en recipientes de 30 litros como en depósi-



203451

tos de 400 litros.

T A B L A IV.

	<u>"N-Z-Amine"</u>		<u>"Neopeptone"</u>	
	<u>30 litros</u>	<u>400 litros</u>	<u>30 litros</u>	<u>400 litros</u>
Recuento de Bacterias	$28 \times 10^9 / \text{c.c.}$	$19 \times 10^9 / \text{c.c.}$	$32 \times 10^9 / \text{c.c.}$	$40 \times 10^9 / \text{c.c.}$
10 Estreptokinasa/c.c.	600 u/c.c.	1170 u/c.c.	600 u/c.c.	430 u/c.c.
Rendimiento total	$18 \times 10^6$	$385 \times 10^6$	$18 \times 10^6$	$150 \times 10^6$

15 Se observará que el agente que comprende la "N-Z-Amine", glicina y un agente reductor de sulfhidrilo, dió rendimientos igualmente buenos en recipientes de 30 litros como lo hizo el medio que comprende "Neopeptone" y resultados muy superiores en depósitos de 400 litros. De hecho, aunque la producción de estreptokinasa por unidad de volumen en el medio de "Neopeptone" descendió bruscamente cuando

20 la fermentación se cambió desde recipientes de 30 litros a depósitos de 400 litros, la producción de estreptokinasa por unidad de volumen en un medio que comprende "N-Z-Amine" casi duplicó cuando la producción se cambió desde recipientes de 30 litros a depósitos de 400 litros. Esto es muy sorprendente en vista del hecho de que el recuento de bacterias en

25 la fermentación de 400 litros en "Neopeptone" fué de más del doble de la fermentación en 400 litros de "N-Z-Amine".

Los mayores rendimientos de enzimas en el medio

10 MAY



203451

de "N-Z-Amine" son con mucho más ventajosos que lo que parecería a primera vista porque a medida que disminuyen las unidades de estreptokinasa por unidad de volumen de medio de fermentación, el problema de recuperar y purificar la estreptokinasa resulta infinitamente más complicado. Esto es porque la estreptokinasa es un material similar a la proteína y debe separarse desde una mezcla que contiene muchas otras proteínas y los procedimientos de separación de que se dispone para tales purificaciones dan como resultado pérdidas tremendas. Esto es especialmente cierto cuando los materiales proteínicos deseados están presentes en cantidades pequeñas. De hecho, la cantidad de estreptokinasa en la citada fermentación en depósitos de 400 litros empleando un medio de fermentación de "Neopeptone" fué tan bajo en comparación con la cantidad de desechos bacterianos y otras impurezas que resultó imposible recuperar un producto de pureza suficiente para uso clínico.

La cantidad de producto de caseína digerido por volumen unidad de medio de fermentación puede variarse dentro de límites relativamente amplios. Si existe interés primordial en la pureza del producto, se recomiendan bajas concentraciones de productos de caseína digerido, por ejemplo 2 a 6 partes en peso de producto digerido por cada 300 partes en volumen de medio. Esto puede ser ventajoso cuando se trata de producir material a usar en inyecciones intravenosas. Por el contrario, si hay interés en el máximo rendimiento total de estreptokinasa por unidad de nitrógeno basal empleado, se recomiendan concentraciones relativamente altas de producto



digerido de caseína, por ejemplo, 10 a 20 partes en peso de producto digerido por cada 300 partes en volumen de medio.

La tabla siguiente representa los resultados de diversas fermentaciones en depósitos de 400 litros en las cuales se varió la cantidad de producto de caseína digerido (N-Z-Amine). Las cifras dadas en la columna encabezada con "Pureza" representan el número de unidades de estreptokina-  
sa por gamma de nitrógeno en el precipitado de actividad no purificada.

10

T A B L A V.

Partes en peso de N-Z-Amine por 300 p. en vol. de medio	Recuento de bacteria	Unidades de estreptokina- nasa por c.c.	Pureza del precipitado
4	$20 \times 10^9$	400	50 u/ gamma
8,7	$40-60 \times 10^9$	1200	20-40 u/ gamma
16	$80 \times 10^9$	2200	5-25 u/ gamma

20

2

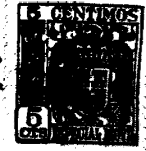
Por esta Tabla se verá que la cantidad óptima de producto de caseína digerido enzimáticamente hidrolizado a emplear depende de si existe interés primordial en la pureza del producto o en el máximo rendimiento.

25

Una forma conveniente de preparar el medio de fermentación puede ser ilustrada por las operaciones siguientes: disuélvase la cantidad deseada de producto digerido de caseína enzimáticamente hidrolizada en unas cinco veces su peso de agua caliente; esterilicése por tratamiento en autoclave o filtración; añadanse soluciones estériles de la glicina y del agente reductor de sulfhidrilo requeridos; añadánse

203451

10 MAY.



soluciones estériles de los materiales favorecedores del crecimiento; y ajústese el pH a aproximadamente 7 a 8. El medio está entonces listo para la inoculación. El anterior procedimiento, desde luego, puede variarse; por ejemplo, si el medio ha de esterilizarse por filtración, todos los ingredientes pueden añadirse antes de la esterilización, y si el medio ha de esterilizarse por tratamiento en autoclave, la glicina puede añadirse antes de la esterilización. A veces es ventajoso en cuanto a la pureza de producto enfriar el medio a 20° C. o menos antes de la filtración; sin embargo si es de importancia primordial el máximo rendimiento, esto no se recomienda.

El inóculo de siembra se prepara poniendo en suspensión un cultivo seco de las bacterias en unos cuantos litros de un medio tal como el citado y que contiene además unas 20 a 70 partes en peso de un azúcar por 1000 partes de nitrógeno basal y cultivando la siembra a una temperatura de 35-39° C. durante unas 8 horas de modo que el recuento bacteriano sea desde  $2 \times 10^9$  a  $2 \times 10^{10}$  por c.c. Un volumen de este inóculo se emplea luego para sembrar el medio de fermentación de modo que se cree un recuento bacteriano original de aproximadamente  $6 \times 10^7$  a  $8 \times 10^8$  por c.c..

Las bacterias deben ser alimentadas con grandes cantidades de un azúcar durante al menos parte de su crecimiento a fin de que produzcan los máximos recuentos de estreptokinasa y estreptodornasa. Casi cualquiera de los tipos comunes de azúcares puede emplearse. Entre los disacáridos que pueden emplearse figuran la sacarosa y la maltosa y entre los

203451



Monosacáridos que pueden emplearse figura la glucosa y la mannososa. Pueden utilizarse satisfactoriamente diversos procedimientos al añadir el azúcar. El procedimiento usual para añadir el azúcar comprende dejar que las bacterias crezcan en presencia de una cantidad muy pequeña, es decir, 20 a 100 partes por 1.000 partes de producto de caseína digerido, durante un periodo de unas 14 horas y añadir luego el resto del azúcar gradualmente durante un periodo de unas 6 a 8 horas. La cantidad total de azúcar que puede añadirse ventajosamente varía dentro de límites relativamente amplios, por ejemplo, de 1.500 a 4.000 partes en peso por 1.000 partes en producto de caseína digerido.

Después de que el medio de fermentación ha sido inoculado se deja fermentar a una temperatura de unos 32-40° C. y con preferencia a 36-38° C. hasta que la concentración de estreptokinasa alcanza un mínimo de unas 200 unidades por c.c. y con preferencia hasta que el recuento bacteriano alcanza un máximo. Durante esta fermentación, el pH debe mantenerse en la gama de aproximadamente pH 6 a pH 8,5. Como el pH tiende a resultar ácido durante la fermentación y especialmente después de que grandes adiciones de azúcar han sido iniciadas, es necesario que se hagan frecuentes determinaciones del pH y se añada álcali para mantener el pH dentro de la gama operativa.

El invento se ilustrará más particularmente por el siguiente ejemplo específico que tiene como finalidad ilustrarlo solamente. Todas las partes son en peso menos que se indique lo contrario.

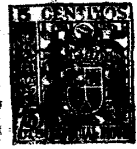
10 M  
10 M  
1956

203451

E J E M P L O

5 A 50 litros de agua destilada se añaden 10,17 kgs. de caseína hidrolizada por enzima (N-Z-Amina). La temperatura se elevó a 100° C. y se mantuvo hasta que la solución de producto de caseína digerido era clara. El recipiente se enfrió luego rápidamente a 15° C. y la solución enfriada se filtró a través de una calidad basta de papel de filtro. Se añadió una pequeña cantidad de tolueno como preservativo y la solución se guardó a 2° C. durante 4 días, al rinal de cuyo tiempo se filtró de nuevo para separar el material insoluble.

15 Se añadieron los siguientes ingredientes a la solución de producto de caseína digerido: 1.165 grs. de  $KH_2PO_4$  disueltos en 8 litros de agua destilada; 35 grs. de cisteína en aproximadamente 800 c.c. de HCl 10% (la cantidad mínima de HCl 10% requerida para obtener una solución clara); 35 grs. de glicina disueltos en 100 c.c. de agua destilada; 300 grs. de dextrosa disueltos en 2 litros de agua destilada; 20 3,5 grs. de uracilo disueltos en 1 litro de agua destilada; 0,35 grs. de ácido nicotínico disueltos en 35 c.c. de agua destilada; 0,59 grs. de piridoxina disueltos en 59 c.c. de agua destilada; 7 grs. de triptofano disueltos en 1 litro de agua destilada; 1,75 grs. de pantotenato de calcio disueltos en 70 c.c. de agua destilada; 25 0,875 grs. de hidrócloruro de tiamina disueltos en 87,5 c.c. de agua destilada; 0,175 grs. de riboflavina disueltos en 1000 c.c. de agua destilada; 700 c.c. de una mezcla de sales; 55,65 c.c. de ácido tioglicólico en 100 c.c. de agua destilada; 700 grs. de  $KHCO_3$  en 500 c.c.



10 MAY

203451

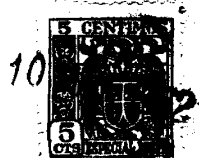
de agua destilada. El medio se ajustó a pH 7,2 y se esterilizó por filtración.

5 El citado medio esterilizado se inoculó con 11  
litros de inóculo de siembra por un recuento bacteriano de  
aproximadamente 20 billones por c.c. El depósito se hizo fer-  
mentar a 37° C. sin ajuste del pH, aireación, u otra modifi-  
cación durante 14 horas al final de cuyo tiempo se añadieron  
320 c.c. de dextrosa 50%. Después de esto el pH se ajustó  
a 7 a intervalos de 15 minutos con hidróxido de sodio 5N. El  
10 volumen de hidróxido de sodio requerido para la neutralización  
se anotó y después de cada ajuste del pH se añadió 115 % de  
este volumen de solución de dextrosa 50%. Al final de unas  
8 horas, el recuento bacteriano había cesado de aumentar y la  
fermentación contenía aproximadamente 1000 unidades de estrepto-  
15 tokinasa por c.c.

Se verá por la anterior discusión que este in-  
vento hace que queden disponibles para uso general estos agen-  
tes terapéuticos en extremo valiosos que hasta ahora solo  
han estado disponibles en cantidades extremadamente limitadas  
20 y además hace posible la producción de estos nuevos agentes  
terapéuticos en una forma más pura que lo que ha sido posi-  
ble hasta ahora incluso en producción limitada en pequeña  
escala.

La presente solicitud, que corresponde a la  
25 presentada en Los Estados Unidos de América, con fecha 8 de  
Junio de 1.951, bajo el número 230.696, se acoge a los bene-  
ficios del artículo 51 del vigente Estatuto Ley sobre Propie-  
dad Industrial.

203451



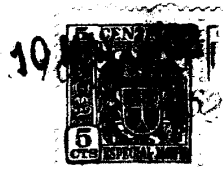
- N O T A -

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

5           1.º.- Mejoras introducidas en la preparación de un medio de fermentación adecuado para el cultivo de bacterias productoras de estreptokinasa y estreptodornasa, caracterizadas por crear un medio nutritivo que contiene caseína hidrolizada por enzima, glicina y un agente reductor de sulfhidrilo.

10           2.º.- Mejoras introducidas en la preparación de un medio de fermentación adecuado para el cultivo de bacterias productoras de estreptokinasa y estreptodornasa, caracterizadas por crear una solución acuosa de 1000 a 10.000 partes en peso de caseína hidrolizada por enzima por cada 150.000 partes en volumen de agua, y que contiene 1 a 350 partes y con preferencia 100 a 200 partes, en peso, de glicina por cada 1000 partes en peso de dicha caseína hidrolizada por encima, y 0,01 a 0,5 y con preferencia 0,03 a 0,07 del peso molecular de un agente reductor de sulfhidrilo por cada 20 1000 partes en peso de dicha caseína hidrolizada por enzima.

3.º.- Mejoras introducidas en el procedimiento de producir mezclas de estreptokinasa y estreptodornasa, ca-



203451

racterizadas por propagar una cepa de estreptococos hemolíticos productores de estreptokinasa-estreptodornasa en un medio de fermentación según los puntos 1º ó 2º.

5 4º.- Mejoras introducidas en la preparación de un medio de fermentación adecuado para el cultivo de bacterias productoras de estreptokinasa y estreptodornasa.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

10 La presente Memoria consta de veinte hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid,

10 MAY. 1952

P. A.  
Alberto de Elzaburu  
Por Poder,  
*Carl*