



337684

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

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

formulada el 7 de Marzo de 1967, con el nº 337.684

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA y KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. entidades japonesas, establecidas en 5-5-1, Ukina, Kita-ku y 4, Ohtemachi-1-chome, Chiyoda-ku, respectivamente, ambas en Tokyo, Japón, por:

" METODO PARA TRATAR LAS CELULAS DE STREPTOCOCCUS HEMOLYTICUS "

La presente invención se refiere al tratamiento de Streptococcus hemolyticus, y a la preparación que contiene dichos microorganismos, y más en particular a una de tales preparaciones que es útil en la inhibición de la formación de tumores.

5

Ya se conocía anteriormente que las cepas de Streptococcus hemolyticus (también llamado "Streptococcus pyogenes") tienen actividad contra los tumores, pero ha sido muy peli-



grosso el uso de tal microorganismo viviente como agente con-
tra los tumores, debido a su carácter patógeno, que efectúa
condiciones tales que causan erisipelas. Para superar estos
defectos, se ha propuesto el uso del microorganismo en for-
5 ma muerta, o un extracto exento de células del mismo. Sin
embargo, estas últimas preparaciones han resultado ser aún
insatisfactorias.

La presente invención proporciona un nuevo método
para tratar las células de Streptococcus hemolyticus para
10 suministrar una preparación que tiene actividad contra los
tumores, y proporciona además tal preparación contra los
tumores, que contiene las células de Streptococcus hemoly-
ticus que no tienen carácter patógeno ni acción hemolítica,
pero que tienen una actividad mucho más potente contra los
15 tumores.

Se ha hallado previamente que la actividad contra
los tumores de las células de Streptococcus hemolyticus es-
tá próxima e inversamente relacionada con la capacidad de
formación de estreptolisina S, y que su actividad contra los
20 tumores aumenta si se cultiva el microorganismo en un medio
que contiene ácido ribonucleico (llamado ARN en lo sucesivo)
o núcleo de ribonucleasa (llamada NRN en lo sucesivo), y que
se obtiene un refuerzo de la actividad contra los tumores
incubando las células del microorganismo, obtenidas por
25 cultivo, en un medio de suspensión que contiene penicilina
a de 30 a 38°C. Sin embargo, el producto resultante no es
aún enteramente satisfactorio como agente contra los tumo-
res. Por tanto, se ha investigado más el asunto, para obte-
ner una preparación más satisfactoria, y se ha hallado que
30 se pueden obtener células del microorganismo, que no tienen

337684



virulencia ni actividad hemolítica, pero que tienen una actividad contra los tumores mucho más potente, por calentamiento sucesivo de las células a 38-50°C.

5 El método de tratamiento de la presente invención comprende, en términos generales, añadir penicilina a una suspensión de células de Streptococcus hemolyticus, en un medio de suspensión, para hacer que la concentración sea mayor de 25.000 unidades de penicilina/ml de suspensión; 10 incubar la mezcla a 30-38°C; y luego calentar más la mezcla, a 38-50°C. La magnitud preferible del primer tiempo de incubación es de 10-30 min, y la del último es de 20-60 min.

15 Como células del microorganismo que se pueden usar en el método de la presente invención, es preferible usar microorganismos Streptococcus hemolyticus ATCC 21059 y 21060 que estén cultivados en un medio sin glucosa adicional. Como ejemplo, se puede usar el caldo (caldo de cultivo) 20 de infusión de carne, y preferiblemente el caldo que contiene ANF o NKF (aproximadamente 0,5-1,0 en peso/volumen). En vez de caldo de infusión de carne se pueden usar para el cultivo otros medios naturales o semisintéticos, pero no se puede añadir glucosa a tales medios, ya que la presencia de glucosa reduce notablemente la actividad contra los tumores. 25 El periodo de cultivo de los microorganismos es preferiblemente de 13 a 20 horas, pero puede ser ligeramente diferente, según la calidad del medio y la cantidad de microorganismo sembrado.

30 Después de tal cultivo, las células de microorganismo así obtenidas (llamadas "cocos" en lo sucesivo) se separan, tal como por centrifugación, y los cocos sedimentados

337684



13 AB

resultantes se suspenden en un medio de suspensión apropiado, tal como una solución salina, preferiblemente en medio básico de Bernheimer (llamado MBB en lo sucesivo), que es la solución (pH entre 6,8 y 7,0) preparada añadiendo malto-
5 sa, KH_2PO_4 y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a agua destilada. También se puede usar como medio de suspensión solución salina tamponada con fosfato. La penicilina se puede añadir previamente, es decir, al anterior medio de suspensión, o se puede añadir a la suspensión de cocos en el medio de suspensión. La canti-
10 dad de penicilina más eficaz es mayor de 25.000 unidades/ml, especialmente 27.000-60.000 unidades/ml.

La suspensión de cocos así obtenida, que contiene penicilina, se incuba primero a 30-38°C, durante más de 10 min, preferiblemente durante 10-30 min, y luego se calienta
15 más a 38-50°C durante 20-60 min. Sobre todo, una primera incubación a 37°C durante 20 min, y un calentamiento sucesivo a 45°C durante 30 min es lo que da los mejores resultados.

Según tal procedimiento, se puede aumentar la actividad contra los tumores de las células de Streptococcus
20 hemolyticus, independientemente de que los cocos sean virulentos o no virulentos; y simultáneamente disminuye mucho la virulencia de los cocos, y se pierde totalmente la capacidad de formación de estreptolisina S.

Para obtener la preparación en forma adecuada para
25 su administración, la suspensión de cocos se hace aséptica después del cultivo, y la suspensión aséptica así obtenida se diluye hasta la concentración deseada.

Los siguientes ejemplos específicos, según la invención, son solo ilustrativos, y no se deben considerar como
30 limitación del ámbito de la invención.

337684



Ejemplo 1.- Concentración preferible de penicilina en la suspensión de estreptococos.

La concentración preferible de penicilina en la suspensión de estreptococos se determinó por el método siguiente (experiencias de lucha contra el cáncer, in vitro e in vivo):

Unas células vivientes de Streptococcus hemolyticus (Cepa Su) ATCC 21060, derivadas de 100 ml de un cultivo de caldo de 20 horas, fueron lavadas dos veces en solución salina fisiológica (llamada en lo sucesivo "solución salina" simplemente), y suspendidas en 5 ml de IBB. La suspensión de cocos original así obtenida fué diluída más, en todos los ejemplos, con IBB, para obtener suspensiones diluídas a 1:5 y 1:10.

A 0,5 ml de solución salina de penicilina G ($2-32 \times 10^4$ unidades/ml) se añadieron 2,5 ml de la suspensión de cocos con dilución de 1/10. El tubo que contenía la mezcla resultante se puso luego en un baño a 37°C , durante 20 min.

Por otra parte, un fluido de ascites lechoso (30 ml), aspirado de ratones que tenían tumores de ascites de Ehrlich, de 8 días de edad, fué centrifugado a 1500 rpm durante 5 min. Las células de carcinoma sedimentadas fueron lavadas una vez con solución salina enfriada a baja temperatura, y una vez con IBB enfriado a baja temperatura, y se volvieron a suspender en IBB, de forma que contuviera 60×10^6 células por ml.

Se añadió 1 ml de la suspensión de células de cáncer a 3 ml de cada suspensión de cocos tratada previamente con penicilina, y se puso la mezcla en un baño a 37°C durante 90 min. La mezcla de suspensión así incubada (que contenía

337684



penicilina) se usó para inoculación intraperitoneal de ratones, con 0,5 ml para cada ratón (1 grupo = 6 ratones).

Los animales que murieron durante el ensayo fueron examinados para determinar la causa de la muerte, y los animales que aún estaban vivos 50 días después de la inoculación fueron sacrificados y se les hizo la autopsia. Al mismo tiempo, se efectuaron paralelamente experimentos de control, usando una mezcla de 0,5 ml de solución de penicilina (32×10^4 unidades/ml), 2,5 ml de MBB y 1 ml de suspensión de células de cáncer.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla 1

Refuerzo de la actividad contra el cáncer del Streptococcus hemolyticus (Cepa Su) ATCC 21060, por tratamiento previo con penicilina, en relación a la concentración de penicilina.

Tratamiento previo de la suspensión de cocos, a 37°C, durante 20 min		Experiencias contra el cáncer in vitro e in vivo				
Dilución de la suspensión original de cocos en MBB	Unidades de penicilina contenidas en la suspensión de cocos diluida (unidades/ml)	Número de supervivientes al cabo de días:				
		10	20	30	40	50
20	$5,4 \times 10^4$	6	6	6	6	6 #
	$2,7 \times 10^4$	6	6	5	5	5 #
	1:10	6	6	1	1	1 #
	$0,7 \times 10^4$	6	4	2	1	1 #
	$0,3 \times 10^4$	6	1	0	-	-
Control	$5,4 \times 10^4$	6	5	1	0	-
(MBB sin cocos)	(sin penicilina)	6	3	0	-	-

30

337684

13 ABR



* Los animales fueron sacrificados y se les hizo la autopsia, sin hallar tumores.

5 Como se muestra en la Tabla 1, las suspensiones de cocos que recibieron un tratamiento previo con penicilina, en concentraciones mayores que $2,7 \times 10^4$ unidades/ml, fueron muy eficaces para causar la inhibición del poder de invasión de las células de cáncer en los ratones. En las concentraciones menores de penicilina, $0,7-1,3 \times 10^4$ unidades/ml, solo se evitó la invasión de las células de cáncer en uno de cada seis ratones.

Ejemplo 2.- Magnitud del tiempo de incubación previa del *Streptococcus hemolyticus* (cepa Su) ATCC 21060 suspendido en MBB que contiene penicilina

15 La concentración de penicilina del Ejemplo 1 se fijó en $2,7 \times 10^4$ unidades/ml. La actividad contra el cancer, dependiendo del periodo de tiempo de incubación previa, se examinó por un método in vitro e in vivo. Los resultados se exponen en la siguiente Tabla 2.

337684



Tabla 2

Efecto de la magnitud del tiempo de incubación previa sobre la actividad contra el cáncer de los estreptococos suspendidos en MBB que contiene penicilina.

5

Dilución de la suspensión original de cocos en MBB	Minutos de incubación previa, a 37°C, de suspensión de cocos diluida, que contiene penicilina (2,7 x 10 ⁴ u./ml)	Experiencias contra el cáncer in vitro e in vivo				
		Número de supervivientes al cabo de días:				
		10	20	30	40	50

10

	0	6	4	3	1	0
1:5	10	6	6	6	6	6 #
	20	6	6	6	5	6 #
	40	6	6	6	6	6 #
	60	6	6	6	6	6 #

15

	0	6	6	6	0	-
1; 10	10	6	6	6	3	3 #
	20	6	6	6	6	6 #
	40	6	6	6	6	6 #
	60	6	6	6	6	5 #

20

Control (sin cocos)	MBB que contiene penicilina (2,7 x 10 ⁴ u./ml) (37°C, 30')	6	3	0	-	-
Control (sin cocos)	solo MBB (37°C, 30')	6	1	1	0	-

25

Los animales fueron sacrificados, y se les hizo la autopsia sin hallar tumores.

Ejemplo 3.- Actividad contra el cáncer, en vivo, de diferentes preparaciones de estreptococos, sobre ratones que tienen cáncer.

30

337684



Unas células vivientes de Streptococcus hemolyticus,
derivadas de 300 ml de un cultivo de caldo de 20 horas, des-
pués de ser lavadas dos veces con solución salina, fueron
suspendidas en 15 ml de MBB. La suspensión original de cocos
5 fué diluida más con MBB, en relación de 1 : 5.

1) A 30 ml de la suspensión de cocos diluida a
1 : 5 se añadieron 6 ml de una solución de penicilina (16×10^4
10⁴ unidades/ml de solución salina).

2) A 30 ml de la suspensión de cocos diluida a 1 : 5
10 se añadieron 6 ml de solución salina.

Una porción de cada fué tratada de la forma siguien-
te:

- a) Suspensión de cocos que contiene solu-
ción salina, incubada a 37° C durante
20 min. A
- 15 b) Suspensión de cocos que contiene solu-
ción salina, incubada a 37° C durante
20 min y calentada más a 45° C durante
30 min. B
- c) Suspensión de cocos que contiene peni-
cilina, incubada a 37° C durante 20 min C
- 20 d) Suspensión de cocos que contiene peni-
cilina, incubada a 37° C durante 20 min
y calentada más a 45° C durante 30 min. D

Se efectuaron paralelamente unas experiencias de
control en las que los ratones que tenían células de cán-
cer fueron tratados con mezcla de MBB y solución salina,
o con mezcla de MBB y penicilina, según se indica a conti-
25 nuación:

337684



- 5
- e) Mezcla de MBB y solución salina, incubada a 37° C durante 20 min. A'
 - f) Mezcla de MBB y solución salina, incubada a 37° C durante 20 min. y calentada más a 45° C durante 30 min. B'
 - g) Mezcla de MBB y penicilina, incubada a 37° C durante 20 min. C'
 - h) Mezcla de MBB y penicilina, incubada a 37° C durante 20 min. y calentada más a 45° C durante 30 min. D'

La actividad contra el cáncer se estimó por los siguientes métodos:

- 10 El fluido de ascites lechoso, aspirado de ratones que tenían carcinoma de ascites de Ehrlich, de 8 días de edad, fué directamente diluido con solución salina, de forma que contuviera aproximadamente 25×10^6 células de cáncer por ml.
- 15 Todos los ratones (1 grupo = 6 ratones) fueron inoculados por vía intraperitoneal con 0,2 ml de suspensión de células de cáncer, y 24 horas más tarde se inyectó por vía intraperitoneal 0,5 ml de una preparación de estreptococos a ensayar, y se suministró la misma dosis durante 4 días
- 20 sucesivos.

337684



Tabla 3

Experiencias comparativas contra el cáncer, en vivo, con cuatro preparaciones de estreptococos distintas.

Serie	Clase de preparaciones de estreptococos usadas para tratar a ratones que tienen cáncer	Número de supervivientes al cabo de días:					
		10	20	30	40	50	
5	Suspensión de cocos en LBB, dilución 1 : 5	A	6	4	2	2	2*
		B	6	5	5	4	3*
		C	6	4	2	2	2*
		D	6	6	6	6	6*
10	Control (sin cocos)	A'	6	0	-	-	-
		B'	6	0	-	-	-
		C'	6	0	-	-	-
		D'	6	0	-	-	-

15 * Los animales fueron sacrificados, y se les hizo la autopsia, sin hallar tumores.

Por la Tabla 3 puede verse que entre las cuatro preparaciones de estreptococos, la preparación D, que se preparó calentando la suspensión de cocos previamente tratada con penicilina, resultó ser la más eficaz.

20 Ejemplo 4.- Ensayo de virulencia con cuatro preparaciones de estreptococos distintas, en animales

La suspensión original de cocos en LBB se preparó como se describe en el Ejemplo 3.

25 Luego se prepararon las cuatro preparaciones de estreptococos distintas siguientes:

337684



- 5
- a) Suspensión de cocos (en MBB) incubada a 37° C durante 20 min (preparación B)
 - b) Suspensión de cocos (en MBB) que contiene penicilina ($2,5 \times 10^4$ unidades/ml), incubada a 37° C durante 20 min (preparación PC-B)
 - c) Suspensión de cocos (en MBB) incubada a 37° C durante 20 min, y calentada luego a 45° C durante 30 min (preparación B-45)
 - d) Suspensión de cocos (en MBB) que contiene penicilina ($2,5 \times 10^4$ unidades/ml), incubada a 37° C durante 20 min, y calentada luego a 45° C durante 30 min (preparación PC-B-45).

Cada preparación fué diluida en serie con MBB, y lo 0,5 ml de cada dilución fué inyectado por via intraperitoneal en un ratón (1 grupo = 2 ratones). Los resultados obtenidos, usando una cepa "Su" (ATCC 21060), casi no virulenta, un mutante de una cepa virulenta "Sv" (ATCC 21059), son los siguientes:

15

Tabla 4

Ensayos comparativos de virulencia, con cuatro preparaciones distintas de estreptococos, cepa Su

(número de ratones que murieron a causa de la infección, en 24 horas)

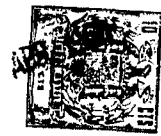
20

Preparación de estreptococos (cepa Su)	Dilución				
	Sin diluir [*]	1:2	1:20	1:50	1:100
B	2	2	0	0	0
PC-B	2	0	0	0	0
B-45	2	2	1	0	0
25 PC-B-45	0	0	0	0	0

^{*}Concentración de cocos 20 veces mayor que la contenida en el cultivo de aguas madres.

Se vé que los ratones que recibieron por via intraperitoneal 0,5 ml de PC-B-45 sin diluir sobrevivieron sin

30



manifiestar infección de estreptococos, aunque los ratones que recibieron B, PC-B o B-45 sin diluir murieron de septicemia debida a los estreptococos, dentro de las 24 horas. Además, la muerte de los ratones debida a la infección fué causada por la B diluída a 1 : 2 o por la B-45 diluida a 1 : 2.

Los resultados obtenidos usando una cepa virulenta "Sv" son los siguientes:

Tabla 5

10

Ensayos comparativos de virulencia, con cuatro preparaciones distintas de estreptococos, de cepa Sv

(número de ratones que murieron a causa de la infección, en 48 horas)

15	Preparación de estreptococos (cepa Sv)	Dilución						
		1:2000*	1:2x10 ⁴	1:2x10 ⁵	1:2x10 ⁶	1:2x10 ⁷	1:2x10 ⁸	1:2x10 ⁹
	B	2	2	2	2	0	0	0
	PC-B	2	2	2	2	1	0	0
	B-45	2	2	2	2	0	0	0
20	PC-B-45	0	0	0	0	0	0	0

*Los cocos contenidos en una dilución 1:2000 de cada preparación de estreptococos corresponden a una dilución 1:100 de los cocos contenidos en el cultivo de caldo madre u original.

Como se muestra en la Tabla 5, la muerte de ratones debida a infección fué causada por diluciones de hasta 1:2.000.000 de las preparaciones B, PC-B y B-45. En contraste, la PC-B-45, incluso en dilución de 1:2000, no mostró virulencia para los ratones.

Como resultado de estos experimentos, el tratamiento térmico de la preparación PC-B virulenta produjo la prepara-



ción PC-B-45, mucho menos virulenta.

Ejemplo 5.- Efecto de la penicilina sobre la capacidad de formación de estreptolisina S (capacidad de formación de ELS) de la suspensión de estreptococos (Streptococcus hemolyticus Cepa Su ATCC 21060)

5 Se formó una serie de tubos, cada uno de los cuales contenía 3 ml de una mezcla de 2,5 ml de la suspensión de cocos original (en LBB) y 0,5 ml de solución de penicilina (24 x 10⁴ unidades/ml), y una serie de tubos de control, cada uno de los cuales contenía 3 ml de una mezcla de 2,5 ml de la suspensión original de cocos (en LBB) y 0,5 ml de solución salina, y todos los tubos de ambas series fueron puestos en un baño a 37°C durante 20 min. Después dos de los tubos, uno que contenía la suspensión de cocos que contiene 10
15 4 x 10⁴ unidades de penicilina por ml, de la primera serie, y otro sin penicilina, de la segunda serie, se pusieron en un baño de agua a la temperatura indicada (0, 37, 45, 56 o 70°C) durante 30 min. Las dos mezclas de suspensión así tratadas se sometieron a los siguientes métodos de ensayo de la capacidad de los cocos para formar ELS:

- 20 1) Separación de los cocos de su suspensión previamente tratada.
- 2) Suspensión de los cocos sedimentados en un medio de sistema de células en reposo (0,1% NRN LBB), seguido por 25 incubación a 37°C durante 2 horas.
- 3) Obtención de un líquido transparente que sobrenada, por centrifugación (3500 rpm, 20') de la suspensión de células en reposo así incubadas.
- 4) Estimación de la actividad hemolítica del líquido 30 que sobrenada.

337684



5 EL líquido transparente que sobrenada fué diluido en serie con solución salina. Se añadió 1 ml de suspensión lavada de eritrocitos de conejo, al 3% a 1 ml de cada líquido que sobrenada, diluido, y se puso en un baño a 37°C durante 2 horas. La actividad hemolítica de los líquidos que sobrenadan fué expresada como unidades, siendo una unidad hemolítica (LUH) la cantidad de ELS que provoca la desaparición gradual de la mitad de los eritrocitos (50% de hemólisis) bajo estas condiciones. Así, el valor de las unidades hemolíticas se usó como criterio de la capacidad de los estreptococos para formar ELS.

10

Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

15	Medio usado para preparar la suspensión de cocos	Tratamiento previo de la suspensión de cocos		Estreptolisina S (UH/ml)
		Incubación a 37°C durante	Puesta durante 30' a	
		20'	0°C	1,971
		20'	37°C	1,318
20	MBB que contiene penicilina (4 x 10 ⁴ u./ml)	20'	45°C	<1
		20'	56°C	<1
		20'	70°C	<1
		20'	0°C	2,457
		20'	37°C	2,076
25	MBB	20'	45°C	3,456
		20'	56°C	<1
		20'	70°C	<1
		20'	0°C	2,457

30 El calentamiento de los cocos suspendidos en MBB que contenía 4 x 10⁴ unidades de penicilina por ml, a 45°C duran-



te 30 min, provocó la pérdida total de su capacidad para formar ELS.

Ejemplo 6

5 A 100 ml de caldo de infusión de carne se añadió NRM, para proporcionar en el medio 0,8% de NRM; el medio fué esterilizado (pH = 7,56).

El cultivo de caldo de 20 horas de Streptococcus hemolyticus (cepa Su) ATCC 21060 fué sembrado en el medio, e incubado a 37°C durante 20 horas.

10 Al final del periodo de incubación, el cultivo de caldo fué enfriado a baja temperatura y centrifugado, y los cocos sedimentados se lavaron 2 veces con solución salina, y fueron suspendidos en 5 ml de MBB, compuesto por 675 mg de maltosa, 6 ml de KH_2PO_4 al 20% (ajustado a pH = 6,9, con
15 NaOH), 12 ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 2%, y 66 ml de agua destilada.

Esta suspensión de cocos así obtenida se volvió a diluir con MBB, para obtener una suspensión diluida 10 veces, y a 2,5 ml de la suspensión diluida de cocos se añadió
20 0,5 ml de solución de penicilina, que se preparó por separado, disolviendo sal de penicilina G-potásica en solución salina, para obtener una concentración de 16×10^4 unidades/ml, y la mezcla se incubó a 37°C durante 20 min, y se siguió calentando a 45°C durante 30 min.

25 A la suspensión de cocos así obtenida se añadió 1 ml de la misma suspensión de células de cáncer que se usó en el Ejemplo 1, y la mezcla se incubó a 37°C durante 60 min. Luego se inyectó 0,5 ml de la suspensión mixta, por vía intraperitoneal, a un ratón. A los 50 días de la inoculación
30 se comprobó el número de supervivientes. Solo murió de cán-



cer uno de cada seis ratones. Los cinco ratones vivos fueron sacrificados y se les hizo la autopsia, sin hallar tumores. Sin embargo, en los experimentos de control, usando MBB solo, y MBB que contenía penicilina, los seis ratones murieron dentro de los 35 días desde la inoculación.

La presente solicitud que corresponde a la presentada en Japón el 8 de Marzo de 1.966, con el número 13784/66, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

NOTA

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

1ª.- Método para tratar las células de Streptococcus hemolyticus, que comprende añadir penicilina a una suspensión de células de Streptococcus hemolyticus en un medio de suspensión, para hacer que la concentración sea mayor que 25.000 unidades/ml; incubar la mezcla a 30-38°C; y luego seguir calentando a 38-50°C.

2ª.- Método según la reivindicación 1, donde el primer periodo de incubación es de 10-30 min, y el calentamiento sucesivo es de 20-60 min.

3ª.- Método según la reivindicación 1, donde el primer periodo de incubación es de 20 min, y el segundo periodo de incubación es de 30 min.

4ª.- Método según la reivindicación 1, donde la concentración de penicilina es de 27.000-60.000 unidades/ml.



5^a.- Método según la reivindicación 1, donde el medio de suspensión es medio basal de Bernheimer, compuesto por maltosa, KH_2PO_4 (+ NaOH) y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y agua destilada.

5 6^a.- Método según la reivindicación 1, donde el medio de suspensión es solución salina tamponada con fosfato.

10 7^a.- Método para tratar las células de Streptococcus hemolyticus, que comprende cultivar Streptococcus hemolyticus en un medio sin glucosa adicional; separar el microorganismo del cultivo de caldo; formar una suspensión de los microorganismos separados, en un medio de suspensión; añadir penicilina a la suspensión, para hacer que la concentración sea mayor que 25.000 unidades/ml; incubar a 30-38°C; y luego seguir calentando a 38-50°C.

15 8^a.- Método según la reivindicación 7, donde el medio de cultivo es caldo de cultivo de infusión de carne, sin glucosa adicional.

20 9^a.- Método según la reivindicación 7, donde el medio de cultivo contiene un miembro elegido del grupo que consta de ácido ribonucleico, núcleo de ribonucleasa, y mezclas de ellos.

25 10^a.- Método según la reivindicación 9, donde la concentración de uno o dos de los miembros del grupo que consta de ácido ribonucleico y núcleo de ribonucleasa es 0,5-1,5 en peso por volumen.

11^a.- Método para tratar las células de Streptococcus hemolyticus.

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

337684

13 ABR 1967

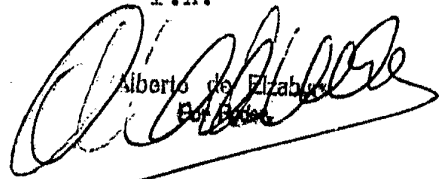


Esta Memoria consta de diecinueve hojas escritas
a máquina por una sola cara.

13 ABR 1967

Madrid,

P.A.



Alberto de Ezabara
Por Deber

337684