

405205

PATENTE DE INVENCION

SG.3945/4097.

405205



Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA SUSTANCIA
ENZIMATICA CON ACTIVIDAD TROMBOLITICA.

Solicitante RHONE-POULENC S.A., entidad francesa, residente en
22 Avenue Montaigne, Paris 8ème, Francia.

F. e. 4-4-75

Int. Cl. C07G, A22j

La presente invención se refiere a una nueva enzima designada a continuación con el número 22.750 RP. y su procedimiento de preparación.

Esta nueva enzima presenta un interés particular como agente trombolítico y puede caracterizarse

5.

- 2 - 405205



in vitro por una actividad proteolítica general.

La enzima 22.750 RP puede obtenerse por cultivo, en medios apropiados, de un microorganismo que pertenece al género *Streptomyces*, identificado más completamente a continuación y designado por la denominación "Streptomyces venetus DS 24288" (NRRL 3987).

- 5.

La enzima 22.750 RP según la invención presenta los caracteres físico-químicos siguientes:

- 10.
- La enzima 22.750 RP es muy soluble en agua, soluble en las mezclas hidroalcohólicas e hidroacéticas muy poco soluble en las soluciones concentradas de sales neutras $\left[\text{NaCl}; (\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4 \right]$ o de polietilenglicol e insoluble en los alcoholes anhidros, la acetona, el hexano, el acetato de etilo, el éter y los disolventes clorados.
- 15.

La enzima 22.750 RP es una proteína que da las reacciones clásicas de las proteínas (reacción del biuret, reacción de Folin, coloración por el rojo Ponceau, el negro amida 12 B N o el azul de Coomassie).

- 20.
- La enzima 22.750 RP contiene carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre. Su composición elemental es aproximadamente de:

C % = 50,4 H % = 7,35 N % = 17 S % = 0,50.

- 25.
- Según su comportamiento en cromatografía sobre gel de dextrano o sobre gel de poliacrilamida, la 22.750 RP tiene una masa molecular de 40.000 ± 5.000 .

- 30.
- La hidrólisis ácida de la enzima 22.750 RP ha permitido poner en evidencia los aminoácidos siguientes para los cuales se indica el contenido en milimoles por cada 10 g de producto: ácido aspártico (11,5), treonina



(8,5), serina (7), ácido glutámico (3,5), prolina (2,5), glicina (13), alanina (7), valina (4,5), metionina (1), isoleucina (2,5), leucina (4), tirosina (5), fenilalanina (2), lisina (3), arginina (2,5) e histidina (2).

5. La enzima 22.750 RP se caracteriza por las propiedades físicas dadas a continuación:

Aspecto: polvo blanco (tras liofilización)

Espectro ultra-violeta (determinación a partir de una solución al 0,03 % en agua)

- 10. absorción a 210 nm $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 187$
- mínimo de absorción a 250 nm $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 4,35$
- máximo de absorción a 278 nm $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 13,55$

Espectro infra-rojo (determinación a partir de comprimidos en mezcla con KBr).

15. Este espectro está representado en la figura 1, en la que se ha llevado en abscisas, por una parte las longitudes de ondas expresadas en micras (escala superior) por otra parte el número de ondas en cm^{-1} (escala inferior) y en ordenadas la densidad óptica.

20. En la tabla I siguiente, se indican las principales bandas de absorción para este producto.

TABLA I

	3280 tF	1515 m	1365 épt.	1040 tf
	3200 épt.	1490 épt.	1330 tf	927 tf
	3060 m	1465 tf	1303 f	920 tf
25.	3040 tf	1455 tf	1280 épt.	825 tf
	2980 épt.	1445 m	1235 m	735 tf
	2960 m	1435 épt.	1165 f	695 f
	2935 f	1418 épt.	1145 tf	hacia 600 m y ancha
	2880 épt.	1405 f	1110 m	530 f
	2650 épt.	1398 épt.	1075 m	470 épt.
	1650 tF	1385 m	1055 tf	430 f
30.	1535 tF	1375 épt.		



tf = muy debil f = debil m = media

tF = muy fuerte épt. = escalón

Poder rotatorio: (determinación a partir de una solución al 0,5 % en agua)

5. $[\alpha]_D^{20} = - 14 \pm 0,5^\circ$
 $[\alpha]_{436}^{20} = - 29,2 \pm 0,6^\circ$
 $[\alpha]_{365}^{20} = - 53,5 \pm 0,8^\circ$

10. La enzima 22.750 RP puede caracterizarse por su comportamiento en electroforisis sobre gel de acetato de celulosa ("Cellogel" N.D. Chemetron) utilizando diferentes tampones:

15. - ácido cítrico - fosfato disódico pH = 2,2 $\mu = 0,09$
- ácido acético - acetato de sodio pH = 4,0 $\mu = 0,1$
- ácido dietil-5,5 barbitúrico (barbital) pH = 8,6 $\mu = 0,075$
- sosa - glicina pH = 9,6 $\mu = 0,1$
(μ = fuerza ionica)

La revelación puede efectuarse por métodos colorimétricos o por medida de la actividad proteolítica.

20. Por ejemplo, a pH = 4,0, el factor activo migra hacia el cátodo; hay desplazamiento de 5 mm/2 horas con una tensión constante de 250 voltios (intensidad que varía de 6 a 15 miliamperios).

25. La actividad enzimática de la 22.750 RP se ejerce sobre un gran número de substratos de naturaleza proteica y en particular sobre la caseina, la hemoglobina, la fibrina. No se ejerce más que muy debilmente sobre el éster etílico de la benzoilarginina (BAEE) y no se ejerce absolutamente sobre el éster etílico de la



acetiltirosina (ATEE).

La actividad sobre la caseina se determina según una técnica inspirada en la de Kunitz puesta a punto por la valoración de la tripsina [M.Kunitz, J. Gen.

- 5. *Physiol.*, 30, 291 (1947)]. Los péptidos solubles en ácido tricloroacético liberados en el transcurso de la hidrólisis se valoran por espectrofotometría (medida de la densidad óptica a 280 nm). La actividad enzimática puede expresarse en unidades Kunitz (U.K.): según la definición de Kunitz, una unidad es la cantidad de enzima que libera bastantes péptidos solubles como para que la densidad óptica a 280 nm del filtrado tricloroacético se eleve en 1,000 en un minuto.

- 10. En la tabla II están reseñados los resultados que se han obtenido con la enzima 22.750 RP según la invención en comparación con dos enzimas proteolíticas cristalizadas: la tripsina y la quimotripsina.

TABLA II

Reacción	Substrato		Actividad		
			U/g 22.750 RP	Tripsina	Quimo- tripsina
Proteolisis	caseina	(a)	11.000	4.000	4.800
	azo-caseina	(b)	28.800	13.300	3.250
	gelatina	(c)	800	4.000	100
Fibrinolisis	cuajo de fibrina bovina	(d)	6.780	29.000	4.000
	cuajo de plasma de conejo	(e)	3.800	2.000	2.700
	cuajo de plasma de perro	(f)	500.000	20.000	10.000
	cuajo de plasma humano	(g)	200.000	10.000	4.000
Esterolisis	B.A.E.E.	(h)	17	34.000	300
	A.T.E.E.	(i)	0	2.000	116.000

405205



En la figura 2 se reproducen estos resultados en forma de diagrama.

(a)	Reacción a pH = 8,0, a 37°C	-	Concentración en substrato = 5 g/l
(b)	" " = 7,5	37°C -	" " " = 12,5g/l
(c)	" " = 7,5	37°C -	Sobre filme de gelatina
(d)	" " = 7,4	37°C -	Concentración en fibrinogeno: 10 g/l
(e)	" " = 7,5	37°C -	" " plasma: 400 cm ³ /l
(f)	" " = 7,4	37°C -	" " " : 200 cm ³ /l
(g)	" " = 7,4	37°C -	" " " : 200 cm ³ /l
(h)	" " = 7,7	25°C -	" " substrato: 5.10 ⁻⁴ M
(i)	" " = 7,0	25°C -	" " " : 5.10 ⁻⁴ M

5. La actividad trombolítica y fibronolítica se ha confirmado sobre animales de laboratorio.

10. A la dosis de 0,5 mg/kg administrada por vía intra-venosa, la enzima 22.750 RP protege, de forma altamente significativa, al conejo frente a la coagulación intravascular inducida por paso en la yugular de un hilo de nylon impregnado de colágeno (técnica inspirada en la de J.L. David y coll., C.R. Soc. Biol., 162, 1763 (1968)). La aceleración de la fibrinolisis puede ponerse en evidencia, en el caso del conejo, a partir de la dosis de 0,05 mg/kg administrada por vía intra-venosa.

15. La toxicidad de la enzima 22.750 RP se ha estudiado en el caso de varias especies animales. En el caso del ratón, la dosis letal 50 % (DL₅₀) se ha determinado por vía intra-venosa: es de 5 mg/kg; es la misma después de administración repetida durante 5 días que después de administración única. En el caso del conejo, la DL₅₀, de-



terminada por vía intra-venosa es de 1,5 mg/kg.

5. Estas propiedades permiten la utilización del producto según la invención en terapéutica humana en la prevención y el tratamiento de las trombosis venosas, de las embolias pulmonares, de las trombosis de las arterias coronarias, de las arterias de las extremidades y de las arterias cerebrales.

10. El organismo productor de la enzima 22.750 RP pertenece al género *Streptomyces* y se designa por la aplicación "*Streptomyces venetus* DS 24 288" (NRRL 3987). Puede obtenerse, haciendo referencia al presente documento, del Ministerio de la Agricultura de los Estados Unidos, laboratorio de Peoria (Illinois).

15. Este organismo se ha aislado de una muestra de tierra tomada en India.

20. El aislamiento de *Streptomyces venetus* DS 24 288 se ha efectuado siguiendo el método general que consiste en poner una pequeña cantidad de tierra en suspensión en agua destilada esteril, diluir la suspensión a diferentes concentraciones, y exponer un pequeño volumen de cada dilución sobre la superficie de cuencos de Petri que contienen un medio nutritivo gelosado. Tras una incubación de algunos días a 26°C, que permite al microorganismo desarrollarse, las colonias que se quieren aislar para proseguir el estudio se toman y se transplantan sobre gelosas nutritivas inclinadas con el fin de obtener cultivos más abundantes.

30. *Streptomyces venetus* DS 24 288 forma esporas ovaladas, que miden de 0,4 a 0,6 μ /1 a 1,2 μ . Sus esporóforos comprenden filamentos esporiferados espirales cuyo



enrollamiento tiene frecuentemente de 5 a 8 vueltas, pero a veces puede ser un poco mayor; muy frecuentemente éstos están insertados aisladamente sobre los filamentos que les soportan, pero se puede observar también esporóferos en racimos de algunos elementos. Por su modo de esporulación, esta cepa se clasifica en la sección Spira de la clasificación de Pridham.

- 5.
- Streptomyces venetus DS 24 288 se desarrolla bien a 25°C y a 37°C pero no a 50°C. Posee la propiedad de producir pigmento melánico negro sobre medio apropiado a la tirosina, produce H₂S, reduce fuertemente los nitratos en nitritos, hidroliza el almidón, licua la gelatina, peptoliza la leche sin coagulación previa y utiliza la celulosa. La coloración de su micelio vegetativo va, según
- 10.
- 15.
- 20.
- los medios, del amarillo al amarillo pardo, pardo amarillo o pardo fuerte; los pigmentos solubles que produce son en general de un tono pardo amarillo más o menos fuerte según los medios, que pueden en ciertos casos alcanzar el pardo negruzco. Su micelio aereo se colorea de azul cuando sobreviene la esporulación.

- Los caracteres de cultivo y las propiedades bioquímicas de Streptomyces venetus DS 24 288 están señaladas en la tabla III. Estos son cultivos que han llegado a un buen estado de desarrollo, es decir de aproximadamente 3 semanas a 25°C salvo indicación en contra.
- 25.
- Estos caracteres se han observado sobre gelosas nutritivas y caldos habitualmente utilizados para determinar los caracteres morfológicos de las cepas de streptomyces, habiéndose efectuado los cultivos sobre medios gelosados sobre gelosas inclinadas. Un cierto número de los medios
- 30.



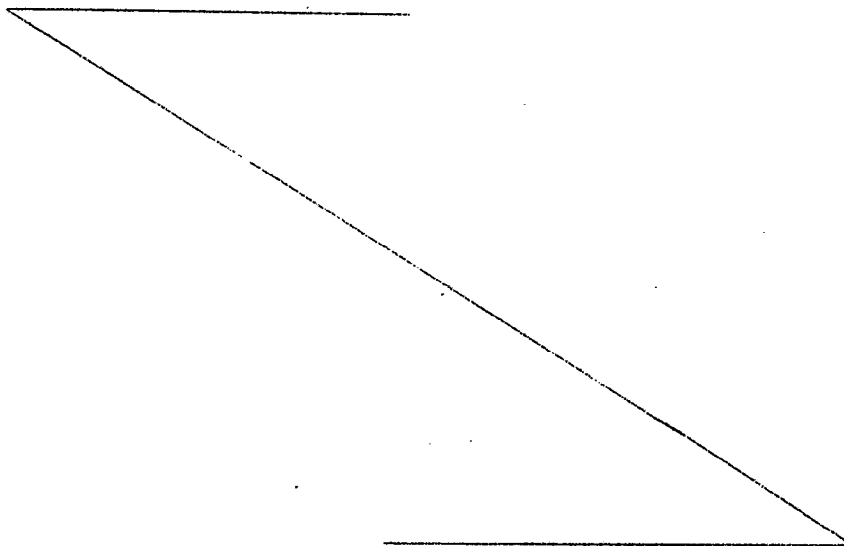
- de cultivo empleados se han preparado según las fórmulas indicadas en "The Actinomycetes", S.A. WAKSMAN, p. 193-197, Chronica Botanica Company, Waltham, Mass., U.S.A., 1950; en este caso están indicados por la letra W seguida del número que se le ha atribuido en "The Actinomycetes". Las referencias o constituciones de los restantes medios de cultivo son las siguientes:
5. - Ref. A - "Hickey and Tresner's Agar" - T.G. PRIDHAM y col. - Antibiotics Annual, 1956-1957, p. 950
10. - Ref. B - K.L. JONES - Journal of Bacteriology, 57, 142, 1949
- Ref. C - Formula W-23 adicionada con 2 % de gelosa
- Ref. D - "Yeast Extract Agar" - T.G. PRIDHAM y col. - Antibiotics Annual, 1956-1957, p. 950
15. - Ref. E - "Tomato Paste Oatmeal Agar" - T.G. PRIDHAM y col. - Antibiotics Annual, 1956-1957, p. 950
- Ref. F - "Melanin formation medium" - The Actinomycetes, vol. 2, p. 333, nº 42 - S.A. WAKSMAN - The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1961
20. - Ref. G - W.E. GRUNDY y col. - Antibiotics and Chem. 2, 401, 1952
- Ref. H - "Inorganic Salts - Starch Agar" - T.G. PRIDHAM y col. - Antibiotics Annual, 1956-1957, p. 951
- Ref. I - "Substrat 1 mit mineralischer Stickstoffquelle", p. 14 - G.F. GAUSE y col., ZUR KLASSIFIZIERUNG DER ACTINOMYCETEN - VEB GUSTAV FISCHER VERLAG. JENA-1958
25. - Ref. J - corresponde a la fórmula, W-1 donde 30 g de sacarosa son reemplazados por 15 g de glucosa
30. - Ref. K - corresponde a la fórmula W-1, donde 30 g de

- 10 405205



sacarosa son reemplazados por 15 g de glicerina

5. - Ref. L - corresponde a la fórmula W-18, donde 30 g de sacarosa son reemplazados por 15 g de glucosa
- Ref. M - corresponde a la fórmula W-18, donde la sacarosa está suprimida y reemplazado por pequeñas bandas de papel filtro sumergidas parcialmente en el líquido
10. - Ref. N - "Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria" - de la Society of American Bacteriologists - Geneva, N.Y., II₅₀-18
- Ref. P - "Plain gelatin" - preparado según las indicaciones del "Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria" - de la Society of American Bacteriologists - Geneva, N.Y. II₅₀-18
15. - Ref. Q - Leche descremada en polvo comercial, reconstituida según las indicaciones del fabricante
- Ref. R - Medio indicado para la investigación de la producción de H₂S por: H.D. TRESNER y F. DANGA - Journal of Bacteriology, 76, 239-244, 1958.
- 20.



405205

- 11 -

TABLA III

Medio de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo (M.v.) o Envés del cultivo	Aparato aéreo (comprendiendo el conjunto del micelio aéreo y de la esporulación)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bio-químicas
Gelosa de Hickey y Tresner (Ref. A)	Muy bueno	Envés pardo negruzco	Azul grisáceo claro. Bien desarrollado	Pardo fuerte, que va hacia pardo negruzco	Esporas ovaladas que miden 0,4 a 0,6/1 a 1,2/1. Esporóforos espirales, no ramificados o en racimos cortos
Gelosa de Bennett (Ref. B)	Bueno	Envés pardo amarillo	Blancuzco a azul claro	Pardo amarillito	
Gelosa de Emerson (Ref. C)	Bueno	M.v. espeso y plisado, pardo amarillo	Blancuzco. En estado de trazas	Pardo amarillo	
Gelosa con extracto de levadura de Pridham (Ref. D)	Bueno	M.v. espeso y plisado, pardo amarillo	Blancuzco a azul claro	Pardo anaranjado	
Gelosa con harina de avena y con extracto de tomates de Pridham (Ref. E)	Bueno	M.v. espeso y plisado, pardo amarillo	Blancuzco a azul claro	Pardo amarillo	
Gelosa glucosa-peptona (W.6)	Bastante bueno	M.v. espeso y plisado, pardo amarillo	Blanco-grisáceo. Muy pobremente desarrollado	Pardo amarillo	

405205



405205

- 11 -

TABLA III

Medio de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo (M.v.) o Envés del cultivo	Apariencia del color aéreo
Gelosa de Hickey y Tresner (Ref. A)	Muy bueno	Envés pardo negruzco	Azul Bien
Gelosa de Bennett (Ref. B)	Bueno	Envés pardo amarillo	Blanca
Gelosa de Emerson (Ref. C)	Bueno	M.v. espeso y plisado, pardo amarillo	Blanco traza
Gelosa con extracto de levadura de Pridham (Ref. D)	Bueno	M.v. espeso y plisado, pardo amarillo	Blanco
Gelosa con harina de avena y con extracto de tomates de Pridham (Ref. E)	Bueno	M.v. espeso y plisado, pardo amarillo	Blanco
Gelosa glucosa-peptona (W.6)	Bastante bueno	M.v. espeso y plisado, pardo amarillo	Blanco pobrem



405205

	Aparato aéreo (comprendiendo el conjunto del micelio aéreo y de la esporulación)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bioquímicas
do	Azul grisáceo claro. Bien desarrollado	Pardo fuerte, que va hacia pardo negruzco	Esporas ovaladas que miden 0,4 a 0,6/1 a 1,2 μ . Esporóforos espirales, no ramificados o en racimos cortos
lo	Blancuzco a azul claro	Pardo amarillo	
do,	Blancuzco. En estado de trazas	Pardo amarillo	
ado,	Blancuzco a azul claro	Pardo anaranjado	
ado,	Blancuzco a azul claro	Pardo amarillo	
ado,	Blanco-grisáceo. Muy pobremente desarrollado	Pardo amarillo	

405205

TABLA III (Continuación)

Medio de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo (M.v.) o Envés del cultivo
Gelosa nutritiva (W-5)	Medio	M.v. pardo amarillo
Gelosa tiro-sina-extracto de levadura para formación de melanina (Ref. F)	Moderado	Envés pardo negruzco
Gelosa al malato de calcio de Krainsky (Ref. G)	Moderado	M.v. amarillo limón
Gelosa a la ovalbúmina (W-12)	Pobre	M.v. incoloro a parduzco, pobremente desarrollado
Gelosa glucosa-asparagina (W-2)	Bastante bueno	M.v. espeso y plisado, amarillo pardo a pardo amarillo
Gelosa glicina-asparagina (W-3)	Bastante bueno	M.v. espeso, pardo amarillo
Gelosa almidones minerales de Pridham (Ref. H)	Bastante bueno	Envés pardo amarillo

Aparato aéreo (comprendiendo el conjunto del micelio aéreo y de la esporulación)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bioquímicas
Nulo	Pardo amarillo	
Gris azul	Negro	Formación de melanina: positiva, (lecturas efectuadas según las recomendaciones del autor)
Blancuzco. En estado de trazas	Nulo	Solubilización del malato: positiva, buena
Blancuzco. En estado de trazas	Amarillo parduzco débil	
Blancuzco a azulado. Bastante pobremente desarrollado	Pardo amarillo	
Blancuzco a azulado. Muy pobremente desarrollado	Pardo amarillo	
Azul grisáceo claro	Nulo	- Esporas ovaladas que miden 0,4 a 0,6/1 a 1,2/μ. Esporofores espirales, no ramificados o en racimos cortos. - Hidrolisis del almidón: positiva

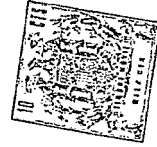
405205



405205

TABLA III (Continuación)

Medio de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo (M.v.) o Envés del cultivo	Aparato del aéreo
Gelosa nutritiva (W-5)	Medio	M.v. pardo amarillo	Nulo
Gelosa tirosina-extracto de levadura para formación de melanina (Ref. F)	Moderado	Envés pardo negruzco	Gris a
Gelosa al malato de calcio de Krainsky (Ref. G)	Moderado	M.v. amarillo limón	Blancuz trazas
Gelosa a la ovalbúmina (W-12)	Pobre	M.v. incoloro a parduzco, pobremente desarrollado	Blancuz trazas
Gelosa glucosa-asparagina (W-2)	Bastante bueno	M.v. espeso y plisado, amarillo pardo a pardo amarillo	Blancuz Bastant desarrollo
Gelosa glicerina-asparagina (W-3)	Bastante bueno	M.v. espeso, pardo amarillo	Blancuz Muy poblado
Gelosa almidon-sales minerales de Pridham (Ref. H)	Bastante bueno	Envés pardo amarillo	Azul gr



405205

ón)

	Aparato aéreo (comprendiendo el conjunto del micelio aéreo y de la esporulación)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bioquímicas
	Nulo	Pardo amarillo	
	Gris azul	Negro	Formación de melamina: positiva, (lecturas efectuadas según las recomendaciones del autor)
	Blancuzco. En estado de trazas	Nulo	Solubilización del malato: positiva, buena
luz- ro-	Blancuzco. En estado de trazas	Amarillo parduzco debil	
lo, do	Blancuzco a azulado. Bastante pobremente desarrollado	Pardo amarillo	
una-	Blancuzco a azulado. Muy pobremente desarrollado	Pardo amarillo	
	Azul grisáceo claro	Nulo	<p>- Esporas ovaladas que miden 0,4 a 0,6/1 a 1,2 μ.</p> <p>Esporóforos espirales, no ramificados o en racimos cortos.</p> <p>- Hidrolisis del almidón: positiva</p>

405205

TABLA III (Continuación)

Medio de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo (M.V.) o Envés del cultivo
Gelosa almidón-nitrato (W-10)	Moderado	Envés pardo amarillo
Gelosa almidón-nitrato mineral de Gause (Ref. I)	Bueno	M.V. espeso y plisado, pardo amarillo
Gelosa sintética de Czapek a la sacarosa (W-1)	Bueno	M.V. espeso y plisado, pardo amarillo
Gelosa sintética de Czapek a la glucosa (Ref. J)	Bueno	M.V. espeso y plisado, amarillo pardo
Gelosa sintética de Czapek a la glicerina (Ref. K)	Medio	M.V. amarillo parduzco claro
Caldo almidón-nitrato (W-19)	Bueno	Velo espeso. Envés amarillo pardo a pardo amarillo
Caldo de Czapek a la sacarosa (W-18)	Moderado	Velo blanco-amarillento
Caldo de Czapek a la glucosa (Ref. L)	Moderado	Velo blanco-amarillento

Aparato aéreo (comprendiendo el conjunto del micelio aéreo y de la esporulación)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bioquímicas
Blancuzco a azul claro	Pardo amarillo	Hidrólisis del almidón: positiva
Azul grisáceo claro	Pardo amarillo fuerte, que va hacia negruzco	
Blancuzco. Muy pobremente desarrollado	Pardo amarillo	
Blancuzco. En estado de trazas	Pardo amarillo claro	
Nulo	Amarillo parduzco claro	Producción de nitritos: fuertemente positiva
Blanco	Amarillo parduzco	Producción de nitritos: fuertemente positiva
Nulo	Nulo o tardío, amarillo débil	Producción de nitritos: fuertemente positiva
Nulo	Nulo o tardío, amarillo débil	Producción de nitritos: fuertemente positiva

405205



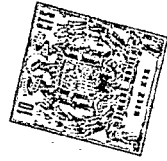
POOR QUALITY

403205

TABLA III (Continuación)

Medio de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo (M.v.) o Envés del cultivo	Aparado el aéreo
Gelosa almidón-nitrato (W-10)	Moderado	Envés pardo amarillo	Blanco
Gelosa almidón-nitrógeno mineral de Gause (Ref. I)	Bueno	M.v. espeso y plisado, pardo amarillo	Azul
Gelosa sintética de Czapek a la sacarosa (W-1)	Bueno	M.v. espeso y plisado, pardo amarillo	Blanco Muy plisado
Gelosa sintética de Czapek a la glucosa (Ref. J)	Bueno	M.v. espeso y plisado, amarillo pardo	Blanco trazas
Gelosa sintética de Czapek a la glicerina (Ref. K)	Medio	M.v. amarillo parduzco claro	Nulo
Caldo almidón-nitrato (W-19)	Bueno	Velo espeso. Envés amarillo pardo a pardo amarillo	Blanco
Caldo de Czapek a la sacarosa (W-18)	Moderado	Velo blanco-amarillento	Nulo
Caldo de Czapek a la glucosa (Ref. L)	Moderado	Velo blanco-amarillento	Nulo

POOR QUALITY



405205

Aparato aéreo (comprendiendo el conjunto del micelio aéreo y de la esporulación)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bioquímicas
Blancuzco a azul claro	Pardo amarillo	Hidrólisis del almidón: positiva
Azul grisáceo claro	Pardo amarillo fuerte, que va hacia negruzco	
Blancuzco. Muy pobremente desarrollado	Pardo amarillo	
Blancuzco. En estado de trazas	Pardo amarillo claro	
Nulo	Amarillo parduzco claro	
Blanco	Amarillo parduzco	Producción de nitritos: fuertemente positiva
Nulo	Nulo o tardío, amarillo débil	Producción de nitritos: fuertemente positiva
Nulo	Nulo o tardío, amarillo débil	Producción de nitritos: fuertemente positiva

POOR
QUALITY

405205

TABLA III (Continuación)

Medio de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo (M.v.) o Envés del cultivo
Caldo de Czapek a la celulosa (Ref. M)	Moderado	Velo blancuzco. Moderadamente desarrollado
Caldo nutritivo no tratado (Ref. N)	Bueno	Anillo bien desarrollado, amarillento
Cultivo sobre patata (W-27)	Bueno	M.v. muy espeso y muy plegado, pardo amarillo fuerte
Gelatina pura al 12% (Ref. P)	Bueno	Colonia central espesa en la superficie M.v. amarillo pardo
Leche descremada 1) a 25°C (Ref. Q)	Bueno	Anillo pardo amarillo claro
2) a 37°C	Bueno	Anillo pardo fuerte
Gelosa de Tresner y Danga (Ref. R)	Bueno	M.v. pardo negruzco

Aparato aéreo (comprendiendo el conjunto del micelio aéreo y de la esporulación)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bio-químicas
Azul grisáceo claro. Moderadamente desarrollado sobre el velo y sobre el papel que emerge del caldo	Nulo	-Producción de nitritos: fuertemente positiva. -Utilización de la celulosa positiva.
Blancuzco. En estado de trazas	Parduzco	Producción de nitritos: fuertemente positiva
Blancuzco. En estado de trazas	Negro	
Blancuzco. Pobremente desarrollado	Amarillo pardo a pardo amarillo	Licuefacción rápida de la gelatina
Nulo		Peptonización sin coagulación. pH que pasa de 6,2 a 6,6 en 1 mes
Nulo		Peptonización sin coagulación. pH que pasa de 6,2 a 6,8 en 1 mes
Nulo	Negro, abundante	Producción de H ₂ S: positiva, (lecturas efectuadas según las recomendaciones de los autores).

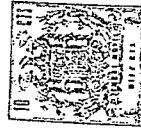
405205



405205

TABLA III (Continuación)

Medio de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo (M.v.) o Envés del cultivo	Apariencia del color y de
Caldo de Czapek a la celulosa (Ref. M)	Moderado	Velo blancuzco. Moderadamente desarrollado	Azulmente veloso de
Caldo nutritivo nitrado (Ref. N)	Bueno	Anillo bien desarrollado, amarillento	Blanco traza
Cultivo sobre patata (W-27)	Bueno	M.v. muy espeso y muy plegado, pardo amarillo fuerte	Blanco traza
Gelatina pura al 12 % (Ref. P)	Bueno	Colonia central espesa en la superficie M.v. amarillo pardo	Blanco rrolla
Leche descremada 1) a 25°C (Ref. Q)	Bueno	Anillo pardo amarillo claro	Nulo
2) a 37°C	Bueno	Anillo pardo fuerte	Nulo
Gelosa de Tresner y Danga (Ref. R)	Bueno	M.v. pardo negruzco	Nulo



405205

ión)

	Aparato aéreo (comprendiendo el conjunto del micelio aéreo y de la esporulación)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bioquímicas
rada-	Azul grisáceo claro. Moderadamente desarrollado sobre el velo y sobre el papel que emerge del caldo	Nulo	-Producción de nitritos: fuertemente positiva. -Utilización de la celulosa positiva.
la-	Blancuzco. En estado de trazas	Parduzco	Producción de nitritos: fuertemente positiva
y llo	Blancuzco. En estado de trazas	Negro	
sa	Blancuzco. Pobrementemente desarrollado	Amarillo pardo a pardo amarillo	Licuación rápida de la gelatina
o	Nulo		Peptonización sin coagulación. pH que pasa de 6,2 a 6,6 en 1 mes
	Nulo		Peptonización sin coagulación. pH que pasa de 6,2 a 6,8 en 1 mes
	Nulo	Negro, abundante	Producción de H ₂ S: positiva, (lecturas efectuadas según las recomendaciones de los autores).



Streptomyces venetus 24.288 presenta un conjunto de caracteres que no coincide exactamente con ninguna de las cepas ya descritas.

- Considerando las especies cuya descripción se ha dado por S.A. WAKSMAN en "The Actinomycetes" (vol. 2, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1961), S. venetus DS 24.288 entraría en la "Serie Viridochromogenes" descrita en la página 149 de esta obra, dadas sus propiedades de producir pigmento melánico, de mostrar un micelio aereo esporulado azul, un micelio vegetativo pardo claro a pardo fuerte, de formar pigmentos solubles que van de amarillo pardo a pardo amarillo o pardo muy fuerte según los casos sobre medios sintéticos u orgánicos, y de presentar esporóforos espirales. Sin embargo no se puede asimilar a ninguna de las tres especies citadas por S.A. WAKSMAN como que constituyen esta serie, a saber: Streptomyces viridochromogenes, Streptomyces chartreusis y Streptomyces cyaneus.
- Por una parte no puede identificarse a S. cyaneus que forma sobre medios gelosados un micelio vegetativo coloreado en azul, lo que no hace jamás; por otra parte y contrariamente a S. venetus DS 24.288, S. cyaneus no utiliza la celulosa y no reduce los nitratos en nitritos.
- Por otra parte no puede asimilarse a S. chartreusis que da un pigmento soluble verde-amarillo a negro sobre gelatina y no da pigmento soluble sobre gelosa nutritiva ni sobre patata, mientras que S. venetus DS 24.288 da un pigmento soluble pardo amarillo sobre gelatina así como sobre gelosa nutritiva y un pigmento soluble negro sobre patata.

405205



Finalmente se diferencia esencialmente de

- S. viridochromogenes por el hecho de que este último forma de una manera característica sobre un cierto número de medios del micelio vegetativo que toma un tinte verde muy fuerte, que incluso puede alcanzar el verde negrozco (en particular sobre gelosa sintética nitrada a la sacarosa, sobre gelatina y sobre gelosa nutritiva);
5. S. venetus DS 24.288 forma un micelio vegetativo que permanece en todos los casos en una gama de tonos que va del amarillo pardo al pardo amarillo y que no se tiñe jamás de verde, igualmente porque no produce jamás pigmento soluble verde fuerte. Además S. viridochromogenes no reduce los nitratos en nitritos, mientras que S. venetus DS 24.288 lo hace de una manera particularmente fuerte y rápida, tanto sobre los medios sintéticos como sobre los medios orgánicos.
- 10.
- 15.

- S.A. WAKSMAN refiere también al "grupo viridochromogenes" un cierto número de cepas descritas por GAUSE y col. (zur Klassifizierung der Actinomyceten, G. Fischer, Jena, 1958): comparándole a estos últimos, que constituyen la mayor parte de la Serie Coerulescens de GAUSE, S. venetus DS 24.288 se situarían en el último grupo que comprende las cepas cuyo micelio vegetativo sobre gelosa almidón-nitrógeno mineral de GAUSE es de color fuerte y que comprende solamente dos especies: Actinomyces (Streptomyces) viridochromogenes y Actinomyces (Streptomyces) coeruleofuscus.
- 20.
- 25.

- S. venetus DS 24.288 difiere de la especie S. viridochromogenes esencialmente por la coloración verde fuerte que puede tomar el micelio vegetativo de
- 30.



405205

- este último sobre un cierto número de medios que S.A. WAKSMAN a citado en su descripción. Se puede notar además en la descripción dada por GAUSE y col. que S. viridochromogenes produce igualmente un micelio vegetativo
5. que toma un tinte verde fuerte sobre leche, sobre gelosa al almidón, sobre patata, sobre gelosa almidón-nitrógeno mineral de GAUSE y no produce pigmento soluble sobre este último medio; comparativamente S. venetus DS 24.288 no da en ningún caso micelio vegetativo verde fuerte sobre estos medios y produce un pigmento soluble pardo amarillo fuerte sobre gelosa almidón-nitrógeno mineral de GAUSE. La formación de un pigmento soluble verde fuerte sobre gelatina, citada por GAUSE en el caso de S. viridochromogenes falta en el caso de S. venetus DS 24.288.
10. S. venetus DS 24.288 no puede identificarse con S. coeruleofuscus que, contrariamente a él, no reduce los nitratos y no utiliza la celulosa; además S. coeruleofuscus no da pigmento soluble sobre medio orgánico gelosado ni sobre patata, mientras que S. venetus DS 24.288 da regularmente, sobre todos los medios orgánicos ensayados, un pigmento soluble pardo amarillo, y sobre patata un pigmento soluble negro.
15. La capacidad de S. venetus DS 24.288 de utilizar diversas fuentes de carbono y de nitrógeno para asegurar su desarrollo se ha determinado según el principio del método de Pridham y Gottlieb (J. of Bact. 56, 107-114, (1948); el grado de desarrollo se ha observado sobre el medio de base indicado por los autores reemplazando bien la glucosa por las diversas fuentes de carbono respectivamente ensayadas, bien $SO_4(NH_4)_2$ por las diversas fuen-
20. 25. 30.



tes de nitrógeno respectivamente ensayadas. Los resultados están indicados en la tabla IV.

TABLA IV

Fuentes de carbono ensayadas	Utilización	Fuentes de nitrógeno ensayadas	Utilización
D-Ribosa	positiva	NO ₃ Na	positiva
D-Xilosa	positiva	NO ₂ Na	positiva
L-Arabinosa	positiva	SO ₄ (NH ₄) ₂	positiva
L-Rammosa	positiva	PO ₄ H(NH ₄) ₂	positiva
D-Glucosa	positiva	Adenina	positiva
D-Galactosa	positiva	Adenosina	positiva
D-Fructosa	positiva	Urea	positiva
D-Mannosa	positiva	L-Asparagina	positiva
L-Sorbosa	negativa	Glicocola	positiva
Lactosa	positiva	Sarcosina	negativa
Maltosa	positiva	DL-Alanina	positiva
Sacarosa	positiva	DL-Valina	positiva
Trehalosa	positiva	Acido DL-aspartico	positiva
Celobiosa	positiva	Acido L-glutámico	positiva
Rafinosa	positiva	L-Arginina	positiva
Dextrina	positiva	L-Lysina	positiva
Inulina	negativa	DL-Serina	positiva
Almidón	positiva	DL-Treonina	positiva
Glicogeno	positiva	Taurina	negativa
Glicerol	positiva	DL-Fenilalanina	positiva
Eritritol	negativa	L-Tirosina	positiva
Adonitol	positiva	DL-Prolina	positiva
Dulcitol	negativa	L-Hidroxiprolina	positiva
D-Mannitol	positiva	L-Histidina	positiva
D-Sorbitol	negativa	L-Triptofano	positiva
Inositol	positiva	Betaina	positiva
Salicina	positiva pero lenta		

El procedimiento de preparación de la enzima

5. 22.750 RP consiste esencialmente en cultivar Streptomyces



venetus DS 24.288 o sus mutantes sobre un medio y en condiciones apropiadas y en separar a continuación la enzima 22.750 RP formada en el transcurso del cultivo.

El cultivo de Streptomyces venetus DS 24.288

5. puede efectuarse por cualquier método de cultivo aerobio en superficie o en profundidad, pero este último tiene preferencia por razones de comodidad. A este fin se utilizan los diferentes tipos de aparatos que son ahora de uso corriente en la industria de las fermentaciones.

10. En particular se puede adoptar la marcha siguiente para la conducción de las operaciones:

Streptomyces venetus DS 24.288 - reserva

↓
cultivo en gelosa

↓
cultivo en ampolla agitada

15. ↓
cultivo inoculum en fermentador

↓
cultivo de producción en fermentador

20. El medio de fermentación debe contener esencialmente una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno asimilables, elementos minerales y eventualmente factores de crecimiento y espesantes, pudiendo ser aportados todos estos elementos en forma de productos bien definidos o por mezclas complejas, tales como las que se encuentran en productos biológicos de diversos orígenes.

25. Como fuentes de carbono asimilable se pueden utilizar hidratos de carbono tales como la glucosa, la sacarosa, la lactosa, las dextrinas, el almidón, las melazas u otras sustancias hidrocarbonadas como las fuentes alcoholes tales como el glicerol o el manitol, o como ciertos ácidos orgánicos: ácidos láctico, cítrico, tar-



tánico,... Algunos aceites animales o vegetales como el aceite de tocino o el aceite de soja pueden reemplazar ventajosamente estas diferentes fuentes hidrocarbonadas, o añadirseles.

5. Las fuentes convenientes de nitrógeno asimilable son extremadamente variadas. Pueden ser sustancias químicas muy simples como los nitratos, las sales minerales u orgánicas de amonio, la urea, los ácidos aminados. También pueden ser aportadas por sustancias complejas que
10. contengan principalmente el nitrógeno en forma protídica: caseína, lactalbúmina, gluten y sus hidrolizados, harinas de soja, de maní, de pescado, extracto de carnes, de levadura, distiller's solubles, corn-steep.

- Entre los elementos minerales añadidos, algunos
15. pueden tener un efecto tampón o neutralizante, como los fosfatos alcalinos o alcalino-térreos o los carbonatos de calcio o de magnesio.

- Otros aportan el equilibrio iónico necesario para el desarrollo del Streptomyces venetus DS 24.288
20. y a la elaboración de la enzima 22.750 RP, como los cloruros y sulfatos de metales alcalinos o alcalino-térreos. Finalmente algunos actúan más especialmente como activadores de las reacciones metabólicas de Streptomyces venetus DS 24.288: estos son las sales de hierro, de cobalto.

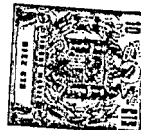
25. Entre los espesadores, los más habitualmente empleados son el almidón, la carboximetilcelulosa, la gelsosa.

- El pH del medio de fermentación al comienzo del cultivo debe estar comprendido entre 6,0 y 7,8, preferentemente entre 6,4 y 7,5. La temperatura óptima para la
- 30.

405205



- fermentación es de 25 - 28°C, pero una producción satisfactoria se obtiene para temperaturas comprendidas entre 23 y 40°C. La aireación de la fermentación puede variar entre valores bastante amplios. Se ha encontrado sin embargo que aireaciones de 0,3 a 2 litros de aire por litro de caldo y por minuto convienen particularmente bien. El rendimiento máximo en enzima 22.750 RP se obtiene después de 1 a 7 días de cultivo, dependiendo este tiempo esencialmente del medio utilizado.
- 5.
10. La enzima 22.750 RP puede extraerse del mosto de fermentación y purificarse por aplicación de los métodos habituales de aislamiento y fraccionamiento de las materias proteicas, controlando la actividad y la pureza del producto por métodos apropiados tales como la determinación de la actividad sobre la caseína y la electrofóresis.
- 15.
20. La enzima 22.750 RP puede aislarse de los mostos de fermentación por filtración del mosto en presencia de un adyuvante de filtración, concentración del filtrado bajo presión reducida, acidificación del filtrado a un pH próximo a 4, filtración y a continuación diálisis del filtrado contra una corriente de agua destilada y a continuación precipitación de la enzima 22.750 RP por adición de acetona al dializado.
- 25.
30. La enzima 22.750 RP así obtenida puede purificarse a continuación por métodos físico-químico usuales. Más particularmente, los métodos de purificación utilizados consisten en disolver la enzima en agua destilada y a continuación precipitar la enzima por adición de agentes en las soluciones acuosas concentradas en las que la



enzima es muy poco soluble, tales como sales neutras.

La enzima 22.750 RP puede purificarse igualmente por cromatografía sobre diferentes soportes tales como la alúmina, la celulosa en polvo, los geles de dextrano o de poliacrilamida, por dialisis o por electrofóresis preparativa.

5.

Los ejemplos siguientes, dados a título no limitativo, muestran como la invención puede ponerse en práctica.

10.

Ejemplo 1

A - Fermentación

Se cargan en un fermentador de 170 litros:

- peptona ... 600 g
- extracto de carne ... 600 g
- 15. - glucosa hidratada ... 1200 g
- aceite de soja ... 120 cm³
- cloruro de sodio ... 600 g
- agua de ciudad complemento para 110 litros

20. El pH se ajusta a 7,50 por adición de 120 cm³ de sosa 10 N. Se esteriliza el medio por borbotado de vapor a 122°C durante 40 minutos. Tras refrigeración el volumen del caldo es de 120 litros, debido a la condensación del vapor durante la esterilización y el pH es igual a 7,0. Se siembra con 200 cm³ de un cultivo en erlenmeyer agitado de Streptomyces venetus DS 24.288.

25. El cultivo se desarrolla a 26°C durante 28 horas agitando y aireando con aire esterilizado con vistas a sembrar el cultivo productor.

30. El cultivo productor se efectúa en un fermentador de 800 litros cargado con las sustancias siguientes:



- corn steep (50 % de extracto seco) ... 8 kg
- aceite de soja ... 6 litros
- sulfato amónico ... 0,8 kg
- cloruro de cobalto hexahidratado ... 0,008 kg
- 5. - agua de ciudad complemento para 360 litros

Tras haber ajustado el pH a 6,40 por adición de 450 cm³ de sosa 10 N, se añade:

- carbonato cálcico ... 2 kg
- a continuación se esteriliza el medio por borboteo de vapor a 122°C durante 40 minutos. Tras refrigeración, el volúmen del caldo es de 390 litros debido a la condensación del vapor durante la esterilización. Se completa a 400 litros por adición de 10 litros de una solución acuosa esteril que contiene:

- 15. - glicosa hidratada ... 4 kg
- el pH es entonces igual a 6,60.

Se siembra con 40 litros del cultivo inoculum en fermentador de 170 litros descrito anteriormente. El cultivo se efectúa a 26°C, durante 116 horas, agitando por medio de una turbina que gira a 260 vueltas/mn y aireando con un volúmen de aire esterilizado de 35 m³/h. El pH final del medio es de 6,80 y el volúmen del mosto de 380 litros. La actividad proteolítica del mosto es de 0,4 U.K./cm³.

25. B - Extracción

360 litros de este mosto se colocan en una cuba provista de un agitador. Se añaden allí 18 kg de adyuvante de filtración, la mezcla se filtra sobre filtro prensa y la torta de filtración se lava por 100 litros de agua.

30. De este modo se obtienen 400 litros de filtrado con una



riqueza de 0,35 U.K./cm³.

405205

El filtrado se concentra bajo presión reducida a una temperatura de 35°C. Se obtienen 30 litros de concentrado con una riqueza de 3,77 U.K./cm³.

5. El pH del concentrado se ajusta a 4,0 por adición de 450 cm³ de ácido clorhídrico 6 N y a continuación se añaden 300 g de adyuvante de filtración. Se filtra y a continuación se lava la torta de filtración por 2 litros de agua. El concentrado clarificado se refrigera a 4°C y se dializa a través de una membrana de celulosa regenerada durante 7 horas contra una corriente de agua destilada a esta misma temperatura.

10. En el dializado obtenido (37 litros), mantenido a 4°C, se añaden bajo agitación 111 litros de acetona previamente refrigerada a -10°C y a continuación se agita aún durante 10 a 15 minutos tras el fin de la adición del disolvente.

15. El precipitado activo se recoge por filtración, se lava con acetona fría, se seca bajo presión reducida (20 mm de mercurio) durante 24 horas a una temperatura próxima a 30°C.

Se obtienen de este modo 997 g de producto con una riqueza de 97 U.K./g.

C - Purificación - fase 1

25. 1915 g de producto bruto preparado en las condiciones descritas anteriormente y con una riqueza de 97 U.K./g se disuelven en 40 litros de agua destilada.

30. En la solución así preparada se añaden lentamente, bajo agitación, 9,6 kg de sulfato amónico cristalizado (cantidad calculada para obtener una solución al 38 % de



- 25 -
405205

la saturación en sal). Se continúa agitando durante 20 minutos tras el fin de la adición de la sal y a continuación se centrifuga a 1800 G. El precipitado obtenido se elimina.

5. En el sobrenadante, se añaden lentamente, bajo agitación, 5 kg de sulfato amónico cristalizado (cantidad calculada para obtener una solución al 52 % de la saturación en sal). Se agita aún durante 15 minutos tras el fin de la adición de la sal y a continuación se deja reposar durante 1 hora. Se centrifuga a 1800 G.

El precipitado activo se recoge, se recibe por 1 litro de agua destilada y la solución obtenida se dializa a través de una membrana de celulosa regenerada durante 24 horas a 4°C contra 40 litros de agua destilada.

15. El dializado se liofiliza; se obtienen 70 g de producto con una riqueza de 1200 U.K./g. Según el análisis electroforético este producto contiene aproximadamente 13 % de factor activo.

D - Purificación - fase 2

20. 102 g de producto preparado en las condiciones precedentes y con una riqueza de 1200 U.K./g se disuelven en 4100 cm³ de agua destilada y se ajusta el pH de la solución a 8,0 por adición de 66 cm³ de sosa N.

25. En la solución así obtenida se añaden lentamente, bajo agitación, 1,25 kg de polietilenglicol 1500. Se agita aún durante 15 minutos tras el final de la adición del agente precipitante. Se deja reposar a continuación durante 15 minutos y a continuación se centrifuga durante 15 minutos a 12.000 G a 4°C.

30. El precipitado activo se disuelve en 700 cm³



de agua destilada y la solución obtenida (800 cm³) se refrigera a 4°C. Se añaden lentamente, bajo agitación, 4 litros de isopropanol refrigerado a -60°C.

5.

El precipitado activo se recoge por centrifugación durante 15 minutos a 3000 G a -10°C, a continuación se seca bajo presión reducida (0,2 mm de mercurio) en presencia de P₂O₅ a una temperatura próxima a 20°C.

10.

De este modo se obtienen 30,7 g de producto con una riqueza de 1600 U.K./g y que contienen, según el análisis electroforético, 20 % aproximadamente de factor activo.

E - Purificación - fase 3

15.

10 g de producto preparado en las condiciones precedentes y con una riqueza de 1600 U.K./g se disuelven en 400 cm³ de agua destilada y el pH de la solución se ajusta a 8,0 por adición de 3 cm³ de sosa N.

20.

En la solución así obtenida se añaden lentamente, bajo agitación, 26,6 cm³ de una solución acuosa al 6 % de lactato de diamino-6,9 etoxi-2 acridina. Tras 15 minutos de agitación suplementaria y a continuación 1 hora de reposo a 4°C, se centrifuga durante 10 minutos a 12.000 G a 4°C.

25.

El precipitado inactivo obtenido se elimina. La solución sobrenadante se concentra bajo presión reducida (0,2 mm de mercurio) a 25°C hasta un volumen de 25 cm³. Se la refrigera entonces a 4°C y se añaden lentamente, bajo agitación, 250 cm³ de isopropanol refrigerado a -60°C.

30.

El precipitado activo se recoge por centrifugación durante 15 minutos a 12.000 G a -10°C, a continua-



ción se seca bajo presión reducida (0,2 mm de mercurio) en presencia de P_2O_5 a una temperatura próxima a 20°C.

Se obtienen de este modo 4,7 g de producto con una riqueza de 2240 U.K./g que contiene, según el análisis electroforético, 37 % aproximadamente de factor activo.

5.

F - Purificación - fase 4

200 mg de producto preparado en las condiciones precedentes y con una riqueza de 2240 U.K./g se disuelven en 3 cm³ de tampón fosfato 0,01 M a pH 6,5 y se añaden 3 cm³ de isopropanol y 4 g de celulosa en polvo para cromatografía.

10.

La pasta así obtenida se coloca bajo un espesor regular en el vértice de una columna de celulosa. La columna tiene 3 cm de diámetro y contiene 80 g de celulosa en una mezcla volúmen a volúmen de isopropanol y de tampón fosfato 0,01 M de pH = 6,5 (lo que representa una altura de 39 cm). Se eluye con una mezcla tampón fosfato-isopropanol, haciendo crecer de forma lineal la

15.

proporción de tampón en la mezcla de 50 a 100 % en volúmenes (volúmen total del eluato con gradiente de composición: 1,5 litros); el caudal es de 35 cm³ hora. El eluato se recoge por fracciones de 20 cm³ aproximadamente y su densidad óptica es medida en continuo por un

20.

analizador "UVICORD L.K.B." a 280 nm. El diagrama obtenido presenta un primer pico muy disimétrico y a continuación, bien separado, un segundo pico simétrico que corresponde a una concentración en tampón comprendida entre 78 % y 92 %. El análisis electroforético muestra

25.

que unicamente este segundo pico contiene el factor ac-

30.



405205

tivo.

5. Se reagrupan las fracciones que corresponden a este segundo pico (fracciones 53 a 70, es decir 415 cm^3), se elimina el alcohol por evaporación bajo presión reducida (2 mm de mercurio), a continuación se dializa a través de una membrana de celulosa regenerada contra 10 litros de agua destilada durante 24 horas a 4°C y se liofiliza.

10. Se obtienen de este modo 43 mg de producto con una riqueza de 6400 U.K./g y que contienen, según el análisis electroforético, 55 % aproximadamente factor activo.

Ejemplo 2

15. 3 g de producto con una riqueza de 1600 U.K./g, preparado en las condiciones descritas en el ejemplo 1-D, se disuelven en 40 cm^3 de tampón barbital $\text{pH} = 8,6$ $\mu = 0,0375$ y esta solución se dializa a través de una membrana de celulosa regenerada durante 48 horas contra 10 litros de este mismo tampón a 4°C .

20. La solución se clarifica entonces por centrifugación durante 15 minutos a 12.000 G a 4°C y a continuación se deposita en el vértice de una columna L.K.B., de tipo PORATH, para electrofóresis preparativa que contiene 1,3 kg de celulosa en tampón barbital $\text{pH} = 8,6$ $\mu = 0,075$ (lo que representa una altura de 66 cm).

25. Se aplica entonces a las bornas del aparato una tensión de 500 voltios (ánodo levantado); la intensidad de corriente es próxima a 0,46 A; la temperatura en el interior de la columna se mantiene en los alrededores de 20°C por circulación en continuo en la doble pared de un líquido de refrigeración a 4°C . A partir de la primera

30.



- hora de la electrofóresis impurezas coloreadas migran en el compartimento anódico. Se elimina el tampón coloreado y se le reemplaza por tampón fresco, repitiendo esta operación tantas veces como sea necesario; la eliminación de estos pigmentos es casi total después de 6 horas de electrofóresis. Se reduce entonces la tensión a 400 voltios ($I = 0,32 \text{ A}$) y se pone en marcha una elución a contra-corriente en la base de la columna, con un caudal de $250 \text{ cm}^3/\text{hora}$; el eluato se recoge en fracciones de 50 cm^3 aproximadamente y su densidad óptica es medida en continuo por un analizador "UVICORD L.K.B." a 280 nm . Tras 15 horas a este régimen se eleva la tensión a 500 voltios ($I = 0,40 \text{ A}$) llevando el caudal de la elución a contra-corriente a $125 \text{ cm}^3/\text{hora}$. Tras 10 horas, es decir 31 horas después del comienzo de la operación, se detiene la electrofóresis y se eluye directamente de arriba hacia abajo con tampón barbital con un caudal de $210 \text{ cm}^3/\text{hora}$.

- El diagrama obtenido presenta un primer pequeño pico (hacia la 23ava hora de electrofóresis) a continuación 3 picos importantes imperfectamente separados. El análisis electroforético muestra que unicamente el tercer pico contiene el factor activo. Se reagrupan las fracciones que corresponden a este tercer pico (es decir, 1425 cm^3), se concentra a 400 cm^3 por evaporación bajo presión reducida (2 mm de mercurio) y a continuación se dializa 3 veces durante 24 horas contra, cada vez, 50 litros de agua destilada a 42°C .

- La solución dializada se concentra a 10 cm^3 por evaporación bajo presión reducida (2 mm de mercurio), a



continuación se refrigera a 4°C. Se añaden lentamente, bajo agitación, 100 cm³ de isopropanol refrigerado a -60°C. El precipitado activo se recoge por centrifugación 10 minutos a 12.000 G a -10°C, a continuación se seca bajo presión reducida (0,2 mm de mercurio) en presencia de P₂O₅ a una temperatura próxima a 20°C.

5.

Se obtienen de este modo 276 mg de producto con una riqueza de 7000 U.K./g y que contienen, según el análisis electroforético, 65 % aproximadamente de factor activo.

10.

Este producto contiene carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre. Su composición elemental es aproximadamente de:

C % = 44,0 H % = 6,5 N % = 12,5 P % = 0,35 S % = 0,65

15.

Su hidrólisis ácida ha permitido poner en evidencia los aminoácidos siguientes para los cuales se ha indicado el contenido en milimoles por cada 10 g de producto: ácido aspártico (8,5), treonina (7), serina (6,5), ácido glutámico (5), prolina (2), glicina (10,5), alanina (7,5), valina (5,5), isoleucina (2), leucina (3), tirosina (3,5), fenilalanina (1), lisina (2), arginina (2) e histidina (1,5).

20.

Presenta las propiedades físicas dadas a continuación:

Aspecto: polvo beige (tras liofilización)

25.

Espectro ultra-violeta: (determinación a partir de una solución al 0,02 % en agua)

absorción a 210 nm $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 205$
 mínimo de absorción a 250 nm $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 7,8$
 máximo de absorción a 278 nm $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 14,1$

405205



Espectro infra-rojo (determinación a partir de comprimidos en mezola con KBr).

Este espectro está representado en la figura 3, en la que se ha llevado en abscisas, por una parte las longitudes de ondas expresadas en micras (escala superior) por otra parte los números de ondas en cm^{-1} (escala inferior) y en ordenadas la densidad óptica.

En la tabla siguiente, se indican las principales bandas de absorción infra-roja para este producto:

10.	3410 tF	1445 m	940 m
	3300 épt.	1385 m	810 f
	3070 épt.	1330 tf	735 épt.
	3015 épt.	1300 f	690 épt.
	2950 m	1235 m	650 épt.
15.	2920 m	1145 f	610 épt.
	2860 f	1120 tf	550 F
	2840 épt.	1090 épt.	480 épt.
	1645 tF	1070 F	460 épt.
	1535 tF	1045 m	420 épt.

20. tF = muy fuerte m = media tf = muy débil
 F = fuerte f = débil épt. = escalón

Poder rotatorio : (determinación a partir de una solución al 0,5 % en agua)

$$[\alpha]_D^{23} = -10,3 \pm 0,3^{\circ}$$

25. $[\alpha]_{436}^{23} = -17,7 \pm 0,3^{\circ}$

La actividad de este producto sobre diversos substratos está indicada en la tabla siguiente:



Reacción	Substrato	Actividad (U/g)
Proteolisis	caseina	7.000
	azo-caseina	15.700
	gelatina	1.000
Fibrinolisis	cuajo de fibrina bovina	2.500
	cuajo de plasma de conejo	4.100
	cuajo de plasma de perro	200.000
Esterolisis	B.A.E.E.	3.000
	A.T.E.E.	500

Ejemplo 3

22,8 g de producto, preparado en las condiciones descritas en el ejemplo 1 etapas A a E pero con una riqueza de 2400 U.K./g, se disuelven en 480 cm³ de agua destilada; el pH de la solución es de 7,4. Las operaciones siguientes se realizan a +4°C.

La solución precedente se coloca en el vértice de una columna de celulosa de 15 cm de diámetro que contiene celulosa impregnada con agua destilada sobre una altura de 17 cm. Se eluye con agua destilada con un caudal de 950 cm³/hora. La densidad óptica del eluato se mide en continuo por un analizador "UVICORD L.K.B." a 280 nm. El diagrama obtenido presenta un pico asimétrico que contiene la enzima, mientras que las trazas de lactato de diamino-6,9 etoxi-2 acridina contenidas en el producto permanecen fijadas sobre la celulosa. El eluato que corresponde a las fracciones absorbentes es recogido (es decir 6,9 litros) y concentrado sin sobrepasar 25°C bajo presión reducida (2 mm de mercurio) hasta

405205



480 cm³.

- 475 cm³ del concentrado precedente se diluyen con 205 cm³ de isopropanol refrigerado a -10°C y la solución obtenida se coloca en el vértice de una columna de celulosa impregnada con una mezcla de isopropanol y agua que contiene 30 % (en volúmen) de alcohol. La columna tiene un diámetro de 15 cm y contiene 600 g de celulosa seca (altura de la celulosa 7 cm). Se eluye con la misma mezcla con un caudal de 450 cm³/hora midiendo en continuo la densidad óptica del eluato a 280 nm por medio de un analizador "UVICORD L.K.B.". El eluato se recoge en fracciones de aproximadamente 20 cm³. El diagrama obtenido presenta dos picos asimétricos. Tras el paso del segundo pico (10 litros de eluato aproximadamente) se hace crecer de forma lineal la proporción de agua hasta el 100 % en la mezcla (volúmen total del eluato con gradiente de composición: aproximadamente 22,5 litros) y a continuación se termina la elución con agua destilada hasta obtención de fracciones que no absorben prácticamente ya a 280 nm (es decir 16 litros aproximadamente). El último pico absorbente eluido por el agua está comprendido entre las fracciones 950 y 1150.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.

- Estas fracciones se reagrupan (es decir 11,6 litros), se concentran bajo presión reducida de 2 mm de mercurio hasta un volúmen de 150 cm³, a continuación se liofilizan.
- 25.

- Se obtienen de este modo 4,5 g de producto con una riqueza de 6400 U.K./g y que contienen, según el análisis electroforético, aproximadamente 60 % de factor activo.
- 30.



1,5 g de producto preparado en las condiciones descritas anteriormente y con una riqueza de 6400 U.K./g se disuelven en 15 cm³ de una solución de cloruro sódico 2.10⁻⁴ M refrigerada a +4°C.

5. Esta solución se coloca en el vértice de una columna de Biogel-P.60 equilibrada a +4°C con el mismo disolvente. La columna tiene un diámetro de 7,5 cm y contiene gel hinchado sobre una altura de 122 cm (lo que corresponde a aproximadamente 280 g de gel seco). Se eluye con el mismo disolvente con un caudal de 120 cm³/hora. El eluato se recoge en fracciones de 35 cm³ aproximadamente y su densidad óptica medida en continuo por medio de un analizador "UVICORD L.K.B." a 280 nm. El diagrama obtenido presenta un pico simétrico en su parte principal con un escalon al comienzo de la elución que revela la presencia de una impureza absorbente.
- 10.
- 15.

20. Se reagrupan las fracciones absorbentes eliminando las que corresponden a la impureza eluida antes del producto principal, es decir las fracciones 65 a 80 (es decir 580 cm³), se concentran bajo presión reducida (2 mm de mercurio) hasta un volumen de 100 cm³ y se liofilizan.

25. Se obtienen de este modo 387 mg de producto con una riqueza de 11.000 U.K./g y que no contienen, según el análisis electroforético, más que un solo constituyente proteico (más del 95 % de factor activo).

N O T A

30. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle



en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a dos solicitudes de patente presentadas en Francia con los nos. y fechas: 71 27449 de 27 de julio de 1971 y

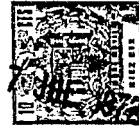
5. de 12 de junio de 1972, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que concedan los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA SUSTANCIA ENZIMATICA CON ACTIVIDAD TROMBOLITICA; caracterizándose por lo siguiente:

1.- Procedimiento para la preparación de una sustancia enzimática con actividad trombolítica designada por el número 22.750 HP, que degrada la caseína, la azocaseína, la gelatina y los cuajos de fibrina y de plasma, caracterizado porque se cultiva en aerobiosis *S. venetus* DS 24.288 (NRRL 3987) sobre un medio nutritivo y en condiciones que convienen a los *Streptomyces*, a continuación se extrae y se purifica una sustancia enzimática sólida por aplicación de los métodos habituales de aislamiento y fraccionamiento de las materias proteicas controlando el enriquecimiento en producto activo.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se purifica la sustancia hasta aproximadamente 65 % de materia activa y se obtiene una enzima con una riqueza de 7000 U.K./g sobre caseína, cuyo espectro ultra-violeta presenta un mínimo de absorción a 250 nm y un máximo de absorción a 278 nm y cuyo espectro infra-rojo está representado en la figura 3.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1,

MM



2
405205

caracterizado porque se purifica la sustancia hasta al menos 95 % de materia activa y se obtiene una enzima con una riqueza de 11.000 U.K./g sobre caseína, cuyo espectro ultravioleta presenta un mínimo de absorción a 250 nm y un máximo de absorción a 278 nm, cuyo espectro infra-

5. rojo está representado en la figura 1, que presenta un poder rotatorio $[\alpha]_D^{20} = -14 \pm 0,52$ y cuya hidrólisis ácida libera por cada 10 g de sustancia las cantidades milimolares siguientes de aminoácidos: ácido aspártico (11,5), treonina (8,5), serina (7), ácido glutámico (3,5), prolina (2,5), glicina (13), alanina (7), valina (4,5), metionina (1), isoleucina (2,5), leucina (4), tirosina (5), fenilalanina (2), lisina (3), arginina (2,5) e histidina (2).

15. 4.- Procedimiento para la preparación de una sustancia enzimática con actividad trombolítica, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria e ilustrado en los dibujos adjuntos.

20. Esta Memoria consta de 36 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 27 JUL. 1972

RHONE-POULENC S.A.

J. GOMEZ ACEBO Y MODET
P. P. Firmado: L. Goeta Fernández