

REF: USSN No. 282,791  
Case X3606



Nº 418.073

Int. Cl. C.12K

## MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un<sup>a</sup>

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: ELI LILLY AND COMPANY

RESIDENCIA: 307 East McCarty Street, INDIANAPOLIS,

Indiana, Estados Unidos

ENUNCIADO: "METODO DE PREPARACION DE UN PERFECCIONADO  
MEDIO DE CULTIVO PARA ENSAYO DE ESTERILIDAD  
DE PRODUCTOS ANTIGENOS"

Prioridad: Patente Estadounidense n.º 282.791 del 22-8-72

RK/



1                   La presente invención se relaciona con un perfec-  
                  cionado medio de cultivo para el ensayo de productos anti-  
                  genos que contienen timerosal y que incluyen una concentra-  
5                   ción de penicilamina o de sus sales de adición ácidas inhi-  
                  bidora del timerosal en el medio de cultivo. La adición de  
                  penicilamina inhibe al timerosal de manera que se desarro-  
                  llen organismos libres y sean observados durante el ensayo.  
                  Hemos descubierto también un método perfeccionado de ensa-  
                  yo de esterilidad en el que se utiliza nuestro perfecciona-  
10                   do medio de cultivo.

                  La adición de penicilamina al medio de cultivo  
                  empleado en el ensayo de esterilidad de productos antígenos  
                  que contienen timerosal inhibe el efecto microbicida  
                  de éste último. La penicilamina es más efectiva, y más con-  
15                   sistentemente efectiva, en la inhibición del timerosal que  
                  los otros compuestos mercaptos. Es muy sorprendente hallar  
                  un compuesto de eficacia tan superior a la de otros com-  
                  puestos aparentemente similares.

                  La penicilamina puede usarse en la práctica de  
20                   nuestro método y en nuestro medio de cultivo como la base  
                  o como sus sales de adición ácidas. Sales de adición áci-  
                  das útiles y ejemplificativas incluyen al hidrobromuro, ni-  
                  trato, fosfato, sulfato y toluenosulfonato. La forma pre-  
                  ferida de uso de la penicilamina en nuestro método es la  
25                   del hidrocioruro, debido a su elevada solubilidad en agua.  
                  El término "penicilamina" se empleará en la siguiente des-  
                  cripción y en las reivindicaciones para incluir a la pro-  
                  pia penicilamina y a sus sales de adición ácidas.

                  Los productos antígenos a los que han de aplicar-  
30                   se los ensayos de esterilidad antes de su liberación para



1 uso por las profesiones médicas incluyen materiales bioló-  
gicos inmunizantes de origen bacteriano y viral, toxinas,  
toxoides y antitoxinas, preparados de ensayo, tales como  
5 la toxina de ensayo cutáneo de la difteria y el antígeno  
de ensayo cutáneo de la papera y productos inmunizantes  
que contienen mezclas de antígenos. Por ejemplo, los si-  
guientes productos antígenos bien conocidos están sujetos  
al requisito de un ensayo de esterilidad:

vacuna catarral

10 toxoides combinados de la difteria y el tétano  
vacunas contra la gripe  
vacuna contra la papera  
vacuna contra la tos ferina  
vacuna contra la rabia

15 vacuna estafilocócica  
vacuna estreptocócica  
toxoides del tétano  
vacuna combinada contra difteria, tétano y tos  
ferina

20 vacuna contra el tifus  
vacuna tifoidea  
vacuna contra virus B  
vacuna contra el herpes simple  
antígeno bacteriano respiratorio

25 antígeno bacteriano estafilocócico-estreptocócico  
vacuna contra el cólera  
vacuna contra el sarampión  
vacuna contra la viruela  
antígeno tifoide

30 toxoide Clostridium perfringens



1                   vacuna leptospira  
                  antitoxina del tétano  
                  vacuna panleucopénica felina

5                   Nuestro perfeccionado método de ensayo de este-  
                  rilidad es aplicable a los anteriores ejemplos y a todos  
                  los productos antígenos que contienen timerosal.

10                   Un ensayo de esterilidad se realiza diluyendo el  
                  producto antígeno a ensayar en un adecuado medio de culti-  
                  vo y observando el desarrollo de microorganismos libres en  
                  el medio de cultivo durante un período de desarrollo en  
                  condiciones adecuadas. Nuestro perfeccionado método de es-  
                  terilidad es efectivo en cualquiera de los medios de culti-  
                  vo útiles en el ensayo de esterilidad. Cualesquiera de ta-  
                  les medios de cultivo útiles son utilizables como base de  
15                   nuestro perfeccionado medio de cultivo.

                  En general, los medios de cultivo útiles para el  
                  ensayo de esterilidad comprenden fuentes disponibles y so-  
                  lubles en agua de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas.  
                  Las infusiones de carne, extracto de levadura, peptonas,  
20                   azúcares y productos de digestión enzimáticos de proteínas  
                  naturales, constituyen fuentes satisfactorias de carbono  
                  y nitrógeno utilizables. Por ejemplo, se emplean la dextro-  
                  sa, el extracto de músculo de vacuno, extracto de corazón,  
                  producto de digestión papaico de proteína de soja, produc-  
25                   to de digestión pancreático de caseína, productos de diges-  
                  tión pépticos de músculo y productos de digestión de gela-  
                  tina. Pueden suministrarse sales inorgánicas como impure-  
                  zas en mínima cuantía en los otros ingredientes o como sa-  
                  les puras.

30                   Por ejemplo, se aceptan los siguientes medios de



1 cultivo para el ensayo de esterilidad por las organizacio-  
nes oficiales responsables:

Medio de tioglicolato flúido

	l-cistina	0,5 g
5	cloruro sódico	2,5 g
	dextrosa	5,5 g
	agar granular (menos del 15% en peso de humedad)	0,75 g
	extracto de levadura soluble en agua	5,0 g
10	producto de digestión pancreático de caseína	15,0 g
	tioglicolato sódico	0,5 g
	resazurina (solución al 0,1%)	1,0 ml
	agua	1.000 ml

15 Medio de producto de digestión caseínico de soja

	producto de digestión pancreático de caseína	17 g
	producto de digestión papaico de harina de soja	3,0 g
20	cloruro sódico	5,0 g
	fosfato potásico dibásico	2,5 g
	dextrosa	2,5 g
	agua	1.000 ml

25 Los siguientes medios de cultivo son ejemplifica-  
tivos de los que resultan útiles para el ensayo de esterili-  
dad y que además son útiles, aunque no aceptados por las  
organizaciones reguladoras, en la práctica de nuestro per-  
feccionado método de ensayo de esterilidad.



1

Medio de tioglicolato alterno

l-cistina	0,5 g
cloruro sódico	2,5 g
dextrosa	5,5 g
extracto de levadura soluble en agua	5,0 g
producto de digestión pancreático	
de caseína	15,0 g
tioglicolato sódico	0,5 g
agua	1.000 ml

5

10

Medio de Sabouraud líquido

dextrosa	20 g
producto de digestión pancreático	
de caseína	5 g
producto de digestión péptico de	
tejido animal	5 g
agua	1.000 ml

15

Medio nutriente

extracto de carne vacuna	3 g
peptona	5 g
agua purificada	1.000 ml

20

Medio de infusión de sesos y corazón

sesos de ternera, infusión	15,80 g
infusión de corazón de vacuno	19,70 g
proteosa o producto de digestión	
pancreático gelisato de gelatina	0,79 g
dextrosa	0,16 g
cloruro sódico	0,40 g
fosfato disódico	0,20 g
agua	1.000 ml

25

30



1	<u>Medio Tween 20 de triptona azolactina</u>		
	producto de digestión pancreático de		
	caseína	20	g
	azolactina	5	g
5	Tween 20 (éster sorbitano polioxi-		
	etilénico)	40	ml
	agua	960	ml
	<u>Medio de infusión de corazón</u>		
	infusión de corazón vacuno	25	g
10	extracto de levadura	10	g
	proteosa o producto de digestión		
	pancreático gelisato de gelatina	10	g
	agua	1.000	ml

15      Nuestro perfeccionado método es efectivo en cualquier medio de cultivo adecuado para ensayo de esterilidad, incluyendo aquellos anteriormente ejemplificados. Los expertos en la materia pueden seleccionar perfectamente un medio de cultivo para un ensayo determinado; ordinariamente el medio es especificado por la organización reguladora.

20      Un ensayo de esterilidad de acuerdo con nuestro perfeccionado método se realiza añadiendo una pequeña cantidad del producto antigéno a ensayar y una pequeña cantidad de penicilamina a una cantidad comparativamente grande de un medio de cultivo tal como los anteriormente ejemplificados. La ventaja de nuestro perfeccionado método reside

25      en la reducción de la necesaria relación entre la cantidad de producto antigéno y la cantidad de medio de cultivo usada en el ensayo.

30      El organismo libre conocido más sensible al timerosal es el Aspergillus niger, habiéndose determinado



1 así la necesaria dilución del producto antigéno mediante  
el empleo de dicho microorganismo como indicador. Un ensa-  
yo convencional, sin el uso de penicilamina, se realiza  
5 diluyendo el producto antigéno en el medio de cultivo de  
manera que la concentración de timerosal en dicho medio  
sea aproximadamente de 1:50.000.000. El A. niger se des-  
arrollará en un medio que contenga dicha concentración de  
timerosal. Si el producto antigéno contiene la concentra-  
ción común de 1:10.000 de timerosal, es necesario diluir  
10 1 ml de dicho producto en 5 litros de costoso medio de cul-  
tivo estéril.

El uso de penicilamina de acuerdo con nuestro  
perfeccionado método de ensayo de esterilidad permite una  
disminución sorprendentemente grande del producto antige-  
15 no en la dilución y por consiguiente en la proporción del  
medio de cultivo empleado. El A. niger se desarrollará en  
un medio de cultivo que contenga una adecuada concentra-  
ción de penicilamina en presencia de concentraciones de  
timerosal inferiores a 1:800.000 aproximadamente. Estas  
20 concentraciones son equivalentes a una dilución de 1 ml  
de producto antigéno, que contenga 1:10.000 de timerosal,  
en unos 80 ml por lo menos de medio de cultivo. Es prefe-  
rible diluir el producto antigéno en el medio de cultivo  
de manera que el contenido en timerosal de dicho medio sea  
25 de 1:800.000 a 1:10.000.000 aproximadamente.

El aspecto de novedad de nuestro perfeccionado  
método de ensayo de esterilidad es la adición de una con-  
centración inhibidora del timerosal de penicilamina al me-  
dio de cultivo en el que se cultiva el producto antigéno.  
30 La preferida gama de concentraciones de penicilamina es del



1 0,05 al 0,5% aproximadamente. "Porcentaje" quiere decir  
aquí "gramos por 100 mililitros". El límite superior del  
0,5% de penicilamina es el máximo aproximado que puede añ-  
dirse sin causar alguna inhibición de algunos organismos li-  
5 bres y sensibles por la propia penicilamina. El límite in-  
ferior de concentración de penicilamina varía algo con la  
concentración permisible de timerosal en el medio de cul-  
tivo. Si es aceptable una elevada dilución del producto  
antígeno y por consiguiente una baja concentración de time-  
10 rosal, resultará entonces adecuada una baja concentración  
de penicilamina. El nivel óptimo de concentración de peni-  
cilamina en las aplicaciones habituales de nuestro método  
es del 0,15 al 0,25% aproximadamente.

15 Los expertos en la técnica microbiológica apre-  
ciarán que unas concentraciones de penicilamina situadas  
fuera del nivel preferido son útiles en la inhibición del  
timerosal en casos específicos, dependiendo del medio de  
cultivo seleccionado y de los particulares organismos li-  
bres que interesen en el producto antígeno.

20 Nuestros perfeccionados medios de cultivo para  
el ensayo de esterilidad comprenden concentraciones de pe-  
nicilamina inhibitoras del timerosal y medios de cultivo  
adecuados para el ensayo de esterilidad. Tales perfeccio-  
nados medios de cultivo son nuevos debido a la presencia de  
25 penicilamina. Los medios de cultivo sobre los que se basan  
nuestros perfeccionados medios son aquéllos bien conocidos  
en la técnica microbiológica e incluyen, aunque sin limi-  
tarse a ellos en modo alguno, los medios anteriormente  
ejemplificados.

30 Los niveles preferidos y óptimos de concentracio-



1 nes de penicilamina en nuestros perfeccionados medios de  
cultivo son iguales a las correspondientes concentraciones  
usadas en nuestro perfeccionado método de ensayo.

5 Hemos demostrado la eficacia de nuestro perfec-  
cionado método de ensayo de esterilidad mediante ensayos  
científicos controlados. En todos los ensayos a indicar  
seguidamente, el organismo de ensayo fue el Aspergillus  
niger, debido a su elevadísima sensibilidad al timerosal.  
10 La concentración de A. niger en los cultivos se expresa  
como titulación, el recíproco del logaritmo de base 10 de  
la máxima dilución en que podría emplearse el cultivo para  
inocular medio estéril fresco.

Como abreviatura de penicilamina se usa PAM.

Ejemplo 1

15 Se efectuó este ensayo para probar la eficacia  
de la penicilamina en cuanto a inhibir el efecto del time-  
rosal. El medio de cultivo usado fue el de tioglicolato  
fluido, cuya fórmula se muestra anteriormente. El medio fue  
esterilizado mediante aplicación de autoclave a una pre-  
20 sión de 15 a 17 libras por pulgada cuadrada (1,05 a 1,19  
kg/cm<sup>2</sup>).

La penicilamina se suministró como solución al  
20% en peso de hidrocloreuro de penicilamina en agua. La so-  
lución fue esterilizada mediante ultrafiltración.

25 Se añadieron contaminaciones controladas de A. ni-  
ger a los cultivos de ensayo desde una suspensión de mate-  
rial que contenía A. niger con una titulación de 6 aproxi-  
madamente. El hongo fue añadido siempre al medio de culti-  
vo después de agregarse el timerosal y la penicilamina.

30 Se ensayó hidrocloreuro de penicilamina al 0,1 y



1 0,2% contra concentraciones de timerosal de 1:400.000 a  
2 1:4.000.000. Se incluyeron controles positivos de penicil-  
3 amina y timerosal. Cada combinación de concentraciones de  
4 penicilamina y timerosal se añadió a doce tubos de medio  
5 de cultivo. Estos tubos fueron divididos en cuatro grupos  
6 de tres cada uno. Se agregaron a los tubos unas cantidades  
7 de suspensión de A. niger que proporcionaron concentracio-  
8 nes de éste último en los cuatro grupos de tubos de  $10^{-3}$ ,  
9  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  respectivamente de la concentración de  
10 la suspensión de material.

11 Se dejaron cultivar los tubos durante 14 días a  
12 una temperatura de 20 a 25°C. Al cabo de este tiempo, se  
13 observó en los tubos el desarrollo del A. niger y se calcu-  
14 ló, mediante el método de Reed y Muench, la titulación, cu-  
15 yo método computa la titulación a partir de la observada  
16 capacidad de desarrollo de las diversas concentraciones de  
17 hongos.

18 Seguidamente se muestran los resultados del en-  
19 sayo, que fueron reproducidos dos veces. Un guión indica  
20 que no se ensayó la combinación individual de timerosal y  
21 penicilamina.

22

---

23

---

24

---

25

---

26

---

27

---

28

---

29

---

30

---



Concentración de timerosal	0,1% PAM		0,2% PAM	
	Reproducción 1	Reproducción 2	Reproducción 1	Reproducción 2
0	6,5	5,5	6,5	5,5
1:1.000.000 (sin PAM)	< 3,5	---	< 3,5	---
1:4.000.000 (sin PAM)	---	< 2,5	---	< 2,5
1:400.000	< 3,5	---	5,0	---
1:800.000	5,0	< 2,5	5,5	4,5
1:1.000.000	5,0	4,0	5,5	5,0
1:2.000.000	---	5,0	---	5,0
1:4.000.000	---	5,0	---	5,0

Los anteriores datos muestran que un 0,1% de penicilamina es suficiente bajo estas condiciones para inhibir una concentración de timerosal de 1:1.000.000 en una mayoría de cultivos individuales. Una concentración de 1:1.000.000 de timerosal en todos los tubos de cultivo es inhibida por una concentración del 0,2% de penicilamina, proporcionando un ensayo seguro con un menor volumen de medio. Cuando se inhibe el timerosal, el A. niger inoculado se desarrolla a una titulación normal de manera que puede ser definitivamente identificado como organismo contaminador en el producto antigéno.

Ejemplo 2

Se cultivó una serie de organismos durante 14 días a una temperatura de 30 a 32°C, en el caso de bacterias, o de 20 a 25°C en el caso de hongos, en medio de tioglicolato fluido estéril y en el mismo medio conteniendo un 0,2% de penicilamina para asegurar que ésta no inhibiese el desarrollo de los organismos. Los resultados se muestran



1 a continuación.

Titulaciones de los organismos

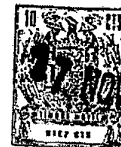
<u>Organismo de ensayo</u>	<u>Control positivo</u>	<u>0.2% PAM</u>
S. aureus	9,0	9,5
5 B. subtilis	7,0	7,5
B. vulgatus	7,0	8,0
P. aeruginosa	8,5	8,5
C. albican	6,5	5,5
S. cerevisiae	7,0	7,0
10 P. notatum	6,5	6,5
A. niger	6,0	6,0

15 Los resultados de este ensayo prueban que la penicilamina no es inhibidora de microorganismos representativos, tales como los que pueden encontrarse en los productos antígenos.

Los ensayos reseñados en los siguientes ejemplos son ensayos de esterilidad de productos antígenos efectivos a los que se han añadido cultivos contaminadores de A. niger.

20 Ejemplo 3

Se ensayó estérilmente una vacuna combinada contra la difteria, tos ferina y tétano, que contenía una concentración de timerosal de 1:10.000, con inoculación añadida de A. niger. Se prepararon cuatro grupos de doce tubos de cultivo de medio de tioglicolato fluido. Se retuvieron doce tubos como controles en blanco. A cada uno de otros 25 12 tubos se añadió un 0,2% de hidrocloreuro de penicilamina como controles positivos. A cada uno de un tercer grupo de 12 tubos se añadió 1 ml de la vacuna, dando una concentración de timerosal de 1:1.000.000. A cada uno de un cuarto 30



1976

1 grupo de 12 tubos se añadió 1 ml de la vacuna y un 0,2% de hidrocloreuro de penicilamina.

5 Cada grupo de 12 tubos fue dividido en grupos de tres y se añadió suspensión de A. niger a los tubos como en el Ejemplo 1. El desarrollo y el cálculo de la titulación tuvieron lugar como en el Ejemplo 1.

Se realizaron cuatro ensayos con diferentes lotes de vacuna. Los resultados se muestran seguidamente.

	<u>Ensayo 1</u>	<u>Ensayo 2</u>	<u>Ensayo 3</u>	<u>Ensayo 4</u>
10 Control en blanco	5,5	5,5	5,5	6,0
Control positivo	5,5	5,5	5,5	5,5
Vacuna añadida	< 3,5	< 3,5	3,0	3,5
Vacuna más PAM añadida	5,5	4,5	5,0	5,0

Ejemplo 4

15 Se efectuaron ensayos similares a los del Ejemplo 3 con un toxoide tetánico líquido que contenía 1:10.000 de timerosal como vacuna de ensayo. Los resultados, usando dos lotes del producto antigénico, se muestran seguidamente. Las concentraciones y procedimiento fueron iguales a los  
20 del Ejemplo 3.

	<u>Ensayo 1</u>	<u>Ensayo 2</u>
Control en blanco	5,5	5,5
Control positivo	5,5	5,5
25 Vacuna añadida	< 3,5	3,5
Vacuna más PAM añadida	4,5	6,0

Ejemplo 5

30 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 3 en el ensayo de tres lotes de vacuna contra el virus de la gripe que contenía 1:10.000 de timerosal. Los resultados se mues-



1 tran seguidamente.

	<u>Ensayo 1</u>	<u>Ensayo 2</u>	<u>Ensayo 3</u>
Control en blanco	5,5	5,5	6,0
Control positivo	5,5	5,5	5,5
5 Vacuna añadida	< 3,5	3,5	3,5
PAM más vacuna añadida	5,0	5,5	5,5

Ejemplo 6

10 Se efectuaron ensayos similares en todos los aspectos a los del Ejemplo 3 sobre una vacuna tifoide que contenía 1:10.000 de timerosal. Los resultados se muestran a continuación.

	<u>Ensayo 1</u>	<u>Ensayo 2</u>	<u>Ensayo 3</u>
Control en blanco	5,5	5,5	6,0
Control positivo	5,5	5,5	5,5
15 Vacuna añadida	< 3,5	< 2,5	< 2,5
Vacuna más PAM añadida	4,5	4,5	5,0

Ejemplo 7

20 Se repitió el procedimiento general del Ejemplo 3 en el ensayo de una vacuna combinada de parainfluenza-3 y bacterina de Pasteurella multocida y Pasteurella haemolytica que contenía 1:20.000 de timerosal. Los dos primeros ensayos a señalar se realizaron en un medio producto de digestión de caseína de soja, usando 40 ml por tubo. La concentración de timerosal en el medio de cultivo era  
25 por consiguiente de 1:800.000. La concentración de penicilamina era del 0,2%. Se ensayaron dos lotes de la vacuna.



	<u>Ensayo 1</u>	<u>Ensayo 2</u>
1 Control en blanco	7,3	7,0
Control positivo	6,7	6,5
Vacuna añadida	<3,5	<3,5
5 Vacuna más PAM añadida	7,3	7,0

Otros dos lotes de la misma vacuna fueron ensayados en un medio de tioglicolato flúido, usando tubos de 40 y 100 ml, que contenían respectivamente 1:800.000 y 1:2.000.000 de timerosal. El contenido de penicilamina fue de nuevo del 0,2%.

Los resultados a 1:800.000 de timerosal fueron los siguientes.

	<u>Ensayo 1</u>	<u>Ensayo 2</u>
Control en blanco	6,0	6,0
15 Control positivo	5,5	5,5
Vacuna añadida	<2,5	<2,5
Vacuna más PAM añadida	5,5	6,0

Ejemplo 8

Se empleó el mismo procedimiento general en el ensayo de una vacuna combinada contra el virus de la rino-traqueitis bovina infecciosa y el virus de parainfluenza-3 y bacterina de Pasteurella multocida y Pasteurella Haemolítica, que contenía 1:20.000 de timerosal. La usada concentración de penicilamina fue del 0,2% en todos los ensayos. Se ensayaron tres lotes con una dilución de 40 ml de medio tioglicolato flúido, concentración de timerosal de 1:800.000, y tres lotes con una dilución de 100 ml de medio de tioglicolato flúido, equivalente a una concentración de timerosal de 1:2.000.000.

Los resultados a 1:800.000 de timerosal se indi-

17 NOV



1 con seguidamente.

	<u>Ensayo 1</u>	<u>Ensayo 2</u>	<u>Ensayo 3</u>
Control en blanco	7,0	5,5	6,0
Control positivo	6,5	5,0	5,5
5 Vacuna añadida	< 3,5	< 2,5	< 2,5
Vacuna más PAM añadida	6,0	5,5	5,0

Los siguientes resultados se obtuvieron a una concentración de timerosal de 1:2.000.000.

	<u>Ensayo 1</u>	<u>Ensayo 2</u>	<u>Ensayo 3</u>
10 Control en blanco	6,0	6,0	6,0
Control positivo	5,5	5,5	6,0
Vacuna añadida	< 2,5	< 2,5	3,5
Vacuna más PAM añadida	6,5	5,5	5,5

15 Todos los ensayos señalados en los Ejemplos 3 a 8 muestran que la penicilamina es altamente eficaz en la inhibición del timerosal en el ensayo de esterilidad. En cada caso, el desarrollo del organismo libre en el medio de cultivo fue severamente reducido por la concentración de timerosal introducida en el sistema de ensayo de esterilidad por el producto antigéno. En cada caso, la adición

20 de penicilamina de acuerdo con nuestra invención al medio de cultivo inhibió al timerosal, de manera que el organismo libre se desarrolló aproximadamente de modo normal. Así, el observador del ensayo, practicando nuestra invención,

25 podría haber observado al organismo libre y apreciado que el producto antigéno bajo en ensayo estaba contaminado y era inaceptable.



1376

REIVINDICACIONES

1

1. Método de preparación de un perfeccionado medio de cultivo para ensayo de esterilidad de productos antígenos que contienen timerosal, que comprende la adición de una concentración inhibidora del timerosal de penicilamina o de una sal de adición ácida de la misma a un medio de cultivo adecuado para el ensayo de esterilidad de productos antígenos.

5

2. Método según la reivindicación 1, en el que la concentración de penicilamina o de una sal de adición ácida de la misma es del 0,05 al 0,5% aproximadamente.

10

3. Método según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la concentración de penicilamina o de una sal de adición ácida de la misma es del 0,15 al 0,25% aproximadamente.

15

4. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:  
METODO DE PREPARACION DE UN PERFECCIONADO MEDIO DE CULTIVO PARA ENSAYO DE ESTERILIDAD DE PRODUCTOS ANTIGENOS.

20

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de dieciocho páginas mecanografiadas.

25

Madrid, 21 agosto 1.973  
BERNARDO UNGRIA  
P.P.

30