

187019



12 FEB. 1949

**MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL**

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

187019

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

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de MERCK & CO., INC., entidad norteamericana, establecida en 126, East Lincoln Avenue, Rahway, Nueva Jersey, Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO DE PREPARAR ESTREPTOMICINA".

-o-

Este invento se refiere a nuevos procedimientos para obtener mayores rendimientos de estreptomycin por fermentación aireada sumergida de agentes nutritivos. Más especialmente, el invento se refiere a la producción de estreptomycin por fermentación aireada sumergida de agentes nutritivos usando como agente de fermentación razas de Streptomyces griseus, cuyo crecimiento inicial y continuado no es impedido por concentraciones de estreptomycin tan altas como de 500 microgramos/ml. y al procedo. para desarrollar estas razas de S. Griseus resistentes a la estreptomycin.

El procedimiento comprende propagar una raza de

125



187019

S. griseus que produce estreptomina en un agente nutritivo que contiene una concentración de estreptomina inicial por lo menos suficiente para retardar el crecimiento del organismo, y desarrollar del micelio producido durante dicha propagación razas de S. griseus caracterizadas por tener mayor resistencia que la raza madre al contenido de estreptomina inicial del agente.

Estas raza-s pueden usarse para preparar estreptomina en mayor rendimiento.

Se ha comunicado por Schatz y Waksman en "Proceedings of the National Academy of Sciences, 51, 129-37, y por Waksman, Reilly y Johnstone en el Journal of Bacteriology 52, 393-7 que, aunque las razas de S. griseus no productoras de estreptomina son sensibles a cantidades de esta última en un agente de cultivo, las razas que producen estreptomina son resistentes a los agentes que contienen cantidades considerables de la misma, y crecen bien en ellos.

Memos descubierto, sin embargo, que las razas de S. griseus que producen estreptomina son en realidad sensibles a altas concentraciones iniciales de estreptomina en el agente. Esto se representa en los siguientes cuadros de crecimiento de una buena raza de S. griseus productora de estreptomina usando inóculos de esporas en un agente de cultivo que contiene cantidades iniciales variables de estreptomina.



187019

Cuadro 1.

Técnica de cultivo agitado (crecimiento sumergido).

	Estreptomicina en el agente inicial: microgramos/ml.	Crecimiento				
		Edad del cultivo en días.				
5	0	2 4	3 4	4 4	5 2	6 2
	100	4	4	4	2	2
	150	4	4	4	2	2
	200	2	4	4	2	2
	250	1	2	3	2	2
10	300	1/2	1 1/2	2	2	2

• Crecimiento registrado a base de observación visual en el campo desde 4 para el crecimiento fuerte hacia abajo.

Cuadro II

Cultivo superficial en agente de agar.

	Estreptomicina en el agente inicial: microgramos/ml.	Crecimiento +	
		2 días	4 días
15	0	4 +	4 +
	100	2 +	3 +
	20	1 +	3 +
	200	1 +	2 +
	250	1/2 +	1 +
25	300	vestigios	vestigios
	400	vestigios	vestigios
	500	vestigios	vestigios

+ Crecimiento registrado a base de observación visual en el campo desde 4 + para el crecimiento fuerte hacia abajo.

Estos resultados muestran que las concentraciones

187019

- 4 -

12 FEB



nes de estreptomycin superiores a 150-200 microgramos/ml. en el agente de cultivo retrasan marcadamente el crecimiento del organismo en los cultivos sumergido y superficial cuando el crecimiento se inicia desde un inóculo de esporas, y que las concentraciones superiores a 300 microgramos/ml. impiden casi por completo el crecimiento del organismo. Este efecto insólito de la estreptomycin en el crecimiento de las razas de *S. griseus* que producen estreptomycin, no fué observado previamente por Schetz y Waksman ni por Waksman, Reilly y Johnstone, probablemente porque no usaron concentraciones de estreptomycin superiores a 100-125 microgramos/ml. en el agente de partida.

Hemos descubierto que la resistencia a las concentraciones altas de estreptomycin es una propiedad que puede crearse o formarse en el organismo por la propagación controlada del mismo en agentes que contienen crecientes cantidades iniciales de estreptomycin. Es preferible al realizar este procedimiento empezar con un agente que contenga una concentración de estreptomycin previamente determinada para impedir marcadamente el crecimiento de la raza particular de *S. griseus*. En tales condiciones, aunque el crecimiento se retarde, habrá considerable crecimiento y desarrollo en un período de incubación de varios días. Así el organismo puede propagarse en presencia de estreptomycin, por cultivo superficial en agar nutritivo o por fermentación aireada sumergida en un agente nutritivo acuoso.

El crecimiento del micelio resultante acumulado

187019

- 5 -



después de varios días de incubación, o una porción del cultivo, se transfieren luego a un nuevo agente que contenga una concentración inicial de estreptomina algo más alta. Este nuevo agente puede también ser un agar nutritivo o un agente acuoso y no es preciso que contenga las mismas sustancias nutritivas que el agente antes empleado.

La concentración de estreptomina en el nuevo agente es con preferencia del orden de 100 microgramos/ml. más alta que la concentración de estreptomina inicial en la preparación anterior. El crecimiento del organismo en presencia de esta concentración más alta es marcadamente impedido, pero en un período de varios días de incubación hay un apreciable crecimiento y desarrollo del cultivo.

Quando se consigue el crecimiento máximo en el agente de mayor contenido de estreptomina, una porción del cultivo se vuelve a transferir a un nuevo agente que contiene una dosis inicial de estreptomina aún más alta, y se incubaba como antes.

Propagando así repetidamente el organismo en agentes que contienen cantidades crecientes de estreptomina, es posible obtener razas de *S. griseus* resistentes que crezcan bien en medios que tengan concentraciones iniciales de estreptomina de 50⁰ a 600 microgramos/ml. y aun más altas. Una raza una vez desarrollada hasta un punto de resistencia a una concentración especial de estreptomina, cuando después se propaga en agentes que tienen concentraciones de estreptomina del mismo orden manifiesta creci-

- 5 -

187019

- 6 -



miento y esporulación normales, indicando así que ha habido un evidente cambio fisiológico en el organismo.

El procedimiento anterior se ha empleado con varias razas de *S. griseus* y, aparentemente, puede emplearse con cualesquiera razas del mismo productoras de estreptomycinina para desarrollar la resistencia de la raza hasta el punto de que crezca fácilmente en agentes que contengan concentraciones iniciales de estreptomycinina de 500 microgramos/ml. o más. Un desarrollo típico de una raza poco resistente hasta una raza muy resistente se ilustra en el siguiente ejemplo:

Ejemplo I

Esporas de una raza normal de *S. griseus* (Waksman n.º. 4) se desarrollaron en agar nutritivo, y en el ensayo se comprobó que era impedido su crecimiento por una concentración de 200-250 microgramos/ml. de estreptomycinina. Las esporas separadas del cultivo de agar se usaron luego para inocular un agente acuoso que contenía como sustancias nutritivas:

20	Peptidase	1%
	NaCl	1%
	Dextrosa	0.9%
	K ₂ HPO ₄	0.1%
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1%
25	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.002%
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0002%
	CaCl ₂	0.01%
	Agua del grifo	Hasta 100%

y que contenía también 250 microgramos/ml. de estreptomycinina, y en medio del agente inoculado se incubó en condiciones sumergidas y aireadas durante un período de cuatro días

187019

125



**MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL**

a temperatura de 27° C. Al final de este tiempo, una porción de 10% del cultivo que contenía el micelio se empleó para inocular un nuevo agente que tenía la misma composición nutritiva pero con 500 microgramos/ml. de estreptomina. La incubación de este agente inoculado mostró crecimiento muy lento, comprobando que el contenido de estreptomina había sido aumentado en dosis demasiado grandes. Sin embargo, hubo apreciable crecimiento del organismo, y después de incubación durante dos días, una porción del 10% del cultivo que contenía el micelio se usó para inocular un nuevo agente de la misma composición básica, pero con 400 microgramos/ml. de estreptomina. Después de 4 días de incubación una porción del cultivo se empleó para inocular un nuevo agente que contenía 500 microgramos/ml. de estreptomina. Al cabo de cuatro días de incubación, una porción de cultivo se empleó de nuevo para inocular agar nutritivo que contenía 600 microgramos/ml. de estreptomina. Luego el micelio se desarrolló en el agar por incubación a 27°C, para desarrollar una cantidad de la raza resistente a la estreptomina.

El cultivo inicial de esta serie de incubaciones, esto es, la raza Waksman N.º 4, se calculó que rendía sólo 2 + crecimiento de organismo en dos días en un agente nutritivo que contenía 200 microgramos/ml. de estreptomina, al paso que a 300 microgramos/ml. sólo era aparente un vestigio de crecimiento. Como resultado del tratamiento, la raza resistente final o cultivo rindió 3 + creci-

- 8 -
187019



miento en sólo 24 horas en un agente que contenía 500 microgramos/ml. de estreptomina. Propagado en agar nutritivo que contenía 600 microgramos/ml. de estreptomina, el cultivo resistente produjo crecimiento y esporulación normales. En contraste con esto, el cultivo madre, esto es, el Waksman n.º 4, mostró sólo un vestigio de crecimiento y nada de esporulación en agar nutritivo que contenía una concentración de estreptomina de 250 microgramos/ml.

También hemos descubierto que razas de *S. griseus*, que se han desarrollado hasta un punto de alta resistencia a la estreptomina, producen rendimientos de ésta apreciablemente más altos cuando crecen en un agente nutritivo en condiciones aireadas y sumergidas que los rendimientos que pueden obtenerse de la raza madre en las mismas condiciones. El aumento hallado en el rendimiento de estreptomina fué en general del orden de 10 a 25%, aunque no son infrecuentes aumentos hasta de un 50%. Ejemplo típico de la producción de rendimientos aumentados de estreptomina por razas de *S. griseus* resistentes a la misma en diferentes agentes nutritivos, y de los rendimientos más altos obtenidos en comparación con los de la raza madre de *S. griseus* se representan en los siguientes ejemplos.

Ejemplo II

Se prepararon dos agentes de la siguiente composición:

Agente A: - 1% Dextrosa, 1% N-Z-amina tipo A
(Digestión pancreática de caseína suministrada por Sheffield

187019



Farms C²), 1% NaCl, 0.6% extracto de carne, agua hasta 100%, pH 6.3-6.5.

Agente B: lo mismo que el agente A pero con adición de 0.3% de K₂HPO₄.

5 Dos frascos de cada agente se inocularon con la raza madre de *S. griseus* empleada en el ejemplo I, y dos frascos de cada agente se inocularon con la raza final de *S. griseus* (resistente a 600 microgramos/ml. de estreptomina) obtenida en el Ejemplo I. Los frascos se incubaron a 28° C durante 72 horas en condiciones de cultivo aireadas sumergidas. Luego nuevos frascos que contenían los mismos agentes se inocularon con crecimiento vegetativo de los frascos iniciales, y se incubaron en las mismas condiciones. A intervalos de 24, 48, 72 y 96 horas se tomaron muestras de los varios frascos para su ensayo en cuanto a contenido de estreptomina. Los rendimientos comparativos a los diferentes intervalos de tiempo figuran en el siguiente cuadro:

		Microgramos/ml. de estreptomina				
20	Cultivo	Agente	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
	Madre	A	96	192	148	163
			55	214	124	160
		B	48	153	119	139
			60	108	140	150
25	Resistente	A	92	221	217	232
			87	188	205	239
		B	110	158	242	264
			83	181	263	240

Ejemplo III

30 Un agente de caldo de levadura de pH 6.5 que se

187019

- 10 -



preparó tenía la siguiente composición:

5
1.0% .NaCl
1.0% dextrosa
0.5% NaNO₃
0.1% MgSO₄
0.1% K₂HPO₄
0.01% CaCl₂
10 mg/litro FeSO₄.7H₂O
2 mg/litro ZnSO₄.7H₂O
10
Agua del grifo hasta 100% volumen
2.5% de levadura seca de Pfeiffer.

15
Todo salvo el K₂HPO₄ y el CaCl₂ se disolvió junto en agua.
El K₂HPO₄ y el CaCl₂ se disolvieron por separado y se añadieron más tarde. Luego la solución se subdividió y se añadió 2.5% de levadura seca.

20
Se dispuso un total de 240 frascos, cada uno de los cuales contenía 40 cm³ del caldo de levadura, esterilizado a 120° C y a presión de 7,5 kg., y se dividieron en 5 grupos de 48 frascos cada uno. Los 48 frascos de un grupo se inocularon con una suspensión de esporas de la raza Waksman n^o. 4 de *S. griseus*. Los frascos de los otros cuatro grupos se inocularon con esporas de 4 razas diferentes de *S. griseus* obtenidas por el procedimiento descrito en el ejemplo I, y que tenían la propiedad de resistencia a 600
25
microgramos/ml. de estreptomycin.

30
Los frascos inoculados se incubaron a 28° C en condiciones aireadas y sumergidas, practicándose la aireación por un agitador giratorio que funcionaba a 210 revoluciones por minuto. Al cabo de tres y cuatro días de incubación se tomaron muestras de todos los frascos, se aparearon por duplicado y se ensayaron en cuanto al contenido de



187019

estreptomomicina (24 ensayos para cada inóculo). El rendimiento medio de estreptomomicina, así como los rendimientos máximo y mínimo que arrojaron los ensayos individuales de las cinco distintas **figuran** en el siguiente cuadro;

5

Estreptomomicina en microgramos/ml.

Raza	3 días			4 días		
	Promedio de 24h.	Mínimo	Máximo	Prom. de 24h.	Mínimo	Máximo
Madre	226	132	300	260	171	348
Resistente A	312	248	430	290	204	380
Resistente B	324	178	386	326	200	412
Resistente C	299	224	360	317	268	380
Resistente D	299	240	360	292	232	380

10

15

20

25

El cuadro anterior muestra claramente los mayores rendimientos obtenidos con las razas resistentes. La ventaja más sorprendente aparece al cabo de tres días de incubación, cuando se observará que el rendimiento mínimo de dos de las razas resistentes es apreciablemente más alto que el rendimiento medio de la raza madre, y que el rendimiento medio de todas las razas resistentes es tan bueno como el rendimiento máximo de la raza madre, o mejor. Una comparación de los rendimientos al cabo de tres o cuatro días de incubación indica que se consiguen altos rendimientos en tiempo más breve con la raza resistente que con la raza madre. Esto es de **capital** importancia porque es evidente que la reducción del período de incubación óptimo de 4 días a 3 significa un aumento como de un $33 \frac{1}{3} \%$ en la capacidad potencial del equipo de fermentación disponible. Esta ventaja, unida a los mayores rendimientos de estreptomomicina se obtienen constantemente en varios agentes cuando se usan

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

12 -

1-253
187019



5 las nuevas razas de *S. griseus* resistentes a la estreptomina, demuestra claramente la importancia comercial de nuestro procedimiento perfeccionado para preparar estreptomina fermentando un agente nutritivo en condiciones de aireación sumergida por medio de una raza de *S. griseus* caracterizada por ser resistente a las concentraciones iniciales de estreptomina de por lo menos 500 microgramos/ml., esto es, que crece normalmente en ellas.

10 Esta solicitud, que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 14 de Febrero de 1948, bajo el Número 8.306, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto Ley sobre Propiedad Industrial.

---- N O T A ----

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

20 1º. Un procedimiento que comprende propagar una raza de *S. griseus* que produce estreptomina en un agente nutritivo que contiene una concentración inicial es estreptomina por lo menos suficiente para retardar el crecimiento del organismo, y desarrollar del micelio producido durante esta propagación razas de *S. griseus* que se caracterizan por tener mayor resistencia al contenido inicial de

12 FEB 1953



187019

estreptomycinina del agente que la raza madre.

5 2º. Un procedimiento según se reivindica en el punto 1º., que comprende emplear el cultivo así formado para inocular un nuevo agente que contiene una concentración inicial más alta de estreptomycinina y propagar el organismo en dicho agente; emplear de nuevo el cultivo así formado para inocular un agente nutritivo de condensación inicial de estreptomycinina aún más alta, y repetir estas propagaciones en agentes que contienen sucesivamente concentraciones ini-
10 ciales más altas de estreptomycinina hasta obtener una raza de *S. griseus* resistente que crezca bien en agentes con una concentración inicial de estreptomycinina de por lo menos 500 microgramos/ml.

15 3º. Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1º. y 2º., en el cual la raza de *S. griseus* que produce estreptomycinina se propaga de un inóculo de esporas en el agente nutritivo.

20 4º. Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1º. a 3º., en el cual se selecciona una raza madre de *S. griseus* que normalmente producirá por lo menos 250 microgramos/ml. de estreptomycinina.

25 5º. Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1º. a 4º., que se caracteriza además por producir rendimientos marcadamente más altos de estreptomycinina que la raza madre cuando se propaga en un agente nutritivo acuoso en condiciones de aireación sumergida.

6º. Un procedimiento según se reivindica en los



187019

5 puntos 1^o. a 5^o., caracterizado además por que produce rendimientos de estreptomicina marcadamente más altos y en períodos de tiempo más cortos que la raza madre cuando se propaga en un agente nutritivo acuoso en condiciones de aireación sumergida.

10 7^o. Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1^o. a 6^o., caracterizado por que se emplea el micelio formado durante dicha propagación para inocular un agente nutritivo que contiene una concentración inicial de estreptomicina aproximadamente de 100 microgramos/ml. más alta que el primer agente mencionado, y por que se repite la propagación e inoculación de agentes sucesivos que tienen concentraciones iniciales de estreptomicina crecientes en aumentos de unos 100 microgramos/ml. hasta que se obtiene
15 una raza de *S. griseus* resistente que crece bien en agentes que contienen una concentración inicial de estreptomicina de por lo menos 500 microgramos/ml.

20 8^o. Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1^o. a 7^o., que comprende hacer fermentar un agente nutritivo acuoso en condiciones de aireación sumergida con dicha raza resistente.

9^o. Un procedimiento según se reivindica en el punto 8^o., en el cual la fermentación se realiza durante tres días.

25 10^o. Un procedimiento según se reivindica en los puntos 8^o. y 9^o., en el cual la fermentación se realiza a



187019

temperatura de unos 28°. C.

11°. Un procedimiento de preparar estreptomicina.

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

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

Madrid a 13 MAY. 1949

P. A.

Alberto de Eizaburu
Por Poder

**MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL**

M/L/L.