

P.- 7288.-

Case 2.647.-

187020

187020



12 FEB 5

MALA FEPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

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

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

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

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE ANTIBIOTICOS".-

5 Este invento se refiere al desarrollo de nuevas razas perfeccionadas del microorganismo *Actinomyces griseus*, por la acción transformante de la luz ultravioleta o la mostaza nitrogenada sobre razas de *A. griseus* que son resistentes a altas concentraciones iniciales de estreptomina en agentes de cultivo y a la utilización de estas razas perfeccionadas para producir estreptomina por procedimientos de fermentación.



187020

Más en especial el invento se refiere al desarrollo de nuevas razas de *A. griseus* que producen constantemente, en condiciones de aireación sumergida, rendimientos de estreptomocina superiores a 800 microgramos/ml, incluyendo una nueva raza preferida llamada *A. griseus* Dulney 1-118, y a la propagación de estas nuevas razas en condiciones de aireación sumergida para la producción de estreptomocina.

McDaniel y Hodges han descubierto un procedimiento para desarrollar razas de *A. griseus* (llamado *Streptomyces griseus* o *S. griseus*) que son altamente resistentes a la estreptomocina, esto es, que crecen bien en los medios que contienen altas concentraciones iniciales de la misma. Así McDaniel y Hodges han descubierto que propagando razas de *A. griseus* en un medio que contiene una concentración inicial de estreptomocina que impide considerablemente el crecimiento del organismo, y transfiriendo micelio que se desarrolla en tales condiciones a medios que contienen sucesivamente altas cantidades iniciales de estreptomocina, pueden obtenerse razas de *A. griseus* que crecen bien en agentes que contienen 500-600 o más microgramos/ml de estreptomocina. Aunque las razas así desarrolladas muestran cierto aumento en el rendimiento de estreptomocina cuando se propagan en un medio nutritivo adecuado, en condiciones de aireación sumergida, el aumento del rendimiento no es del mismo orden que el aumento de resistencia a la estreptomocina, sugiriendo así la idea de que el rendimiento de estreptomocina y la resistencia a la misma dependen de distintas funciones fisiológicas del organismo.

Yo he descubierto ahora que las razas de *A. griseus*



12 49

187020

que se han desarrollado hasta un punto de alta resistencia a la estreptomina tienden a conservar esta resistencia cuando se someten a la acción transformadora de la luz ultravioleta o mostaza nitrogenada. Se ha descubierto también que, sometiendo a la acción de la luz ultravioleta o mostaza nitrogenada una raza de *A. griseus* resistente a por lo menos 500 microgramos/ml de estreptomina, se consigue una incidencia relativamente alta de mutación de razas de rendimiento más alto de *A. griseus*. Seleccionando las mejores de las razas de más altos rendimientos así formadas y repitiendo los procedimientos del tratamiento con luz ultravioleta o mostaza nitrogenada y seleccionando razas perfeccionadas, he desarrollado un número de mutantes que producen de dos a tres veces tanta estreptomina como la raza madre en las mismas condiciones de propagación. El mayor rendimiento de estos mutantes es aun más pronunciado cuando las condiciones de propagación, por ejemplo, la composición del agente, se alteran o regulan a las condiciones óptimas para la propagación del mutante.

En la producción de razas transformadas de *A. griseus* por la acción de la luz ultravioleta con arreglo al presente invento, una suspensión de esporas estéril de la raza de partida, bien en un frasco bien en un plato lleno, se expone a la luz ultravioleta de una nueva longitud de onda muy bacteriocida como, por ejemplo, de unos 2,537 μ , durante un intervalo de tiempo suficiente para matar el 99 % o más de las esporas. El tiempo requerido es en general de varios minutos, pero varía considerablemente en función de la distancia de la fuente luminosa a la suspensión de esporas. Luego la suspensión de



187020

5 esperas supervivientes se diluye luego y se extienden placas
de agar nutritivo, tal como extracto de levadura-agar de dex-
trosa (este es, 1 % de extracto de levadura, 0.5 % de dex-
trosa, 2.0 % de agar). Las colonias de actinomyce^{tos} que
se desarrollan en el agar se transfieren a tubos de ensayo
oblicuos en el mismo agente y se les deja esporular. Las
esporas de estos cultivos se usan para inocular un agente de
fermentación. Un agente adecuado para este objeto tiene la
siguiente composición: harina de soya, 20.0 gm, dextrosa, 10.0 gm
10 cloruro sódico, 10.0 gm. y agua destilada, 1 litro, con prefe-
rencia regulando al pH 7.0-7.2 con hidróxido sódico, 1N antes
de la esterilización. Pero debe entenderse que pueden emplear
se agentes de composición variable en amplios límites. Después
de la inoculación, el agente se incuba a unas 28°C en condicio-
15 nes de aireación sumergida durante un periodo como de 3 a 4
días y luego se ensaya en cuanto al contenido de estreptomycin.

Los rendimientos obtenidos por la propagación de varios
cultivos desarrollados de las esporas que sobreviven a la radia-
ción ultravioleta varían dentro de amplios límites, pero una
20 proporción bastante grande de los cultivos muestra rendimientos
de estreptomycin marcadamente mayores que los producidos por
la raza madre de *A. griseus* resistente a la estreptomycin.
Los mejores de los nuevos cultivos o razas transformadas se
seleccionan y desarrollan como cultivos de repuesto para su
25 uso en el tratamiento ulterior con luz ultravioleta o con mes-
taza nitrogenada.

Es evidente que en este procedimiento de extender en
placas esporas que sobreviven a la luz ultravioleta y de selec-



12 49

187020

ción y desarrollo de nuevas razas supone el manejo de un número considerable de cultivos individuales, y también implica un amplio elemento de azar en la selección de las razas a desarrollar. Aunque ocasionalmente un solo tratamiento ultravioleta y selección de colonias produce un mutante de *A. griseus* que producirá hasta dos veces la cantidad de estreptomocina que la raza madre, el aumento máximo conseguido generalmente en un sólo tratamiento ultravioleta es como de 40-50 %.

5 Cuando los mutantes de rendimiento más alto seleccionados como las mejores razas resultantes de un solo tratamiento se someten a tratamientos adicionales con luz ultravioleta, y las esporas sobrevivientes se desarrollan en nuevos cultivos como se ha descrito arriba, se obtienen ulteriores aumentos de rendimientos de 40-50 % y en ocasiones incrementos más

10 altos. Aunque no es posible continuar indefinidamente aumentando el rendimiento de *A. griseus* en las razas transferidas, los mutantes se pueden obtener fácilmente siguiendo el procedimiento anterior que produce tanto como de 2 a 3 veces la cantidad de estreptomocina que produce la raza de

15 partida resistente a la estreptomocina.

20

La mutación de *A. griseus* por la acción de la mostaza nitrogenada y la producción de mutantes de alto rendimiento se realiza según el procedimiento descrito cuando se usa la luz ultravioleta, salvo que, la suspensión de esporas

25 iniciales se prepara en un neutralizador de fosfato a pH de aproximadamente 8.0 con $(\text{ClCH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}$ a concentración de 0.005M. A esta concentración aproximadamente el 99 % de las esporas quedan muertas en unos 30 minutos, y luego la suspensión de

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL



187020

12 FEB. 1949

5 esporas se diluye con 1 % de glicina y se extienden placas como arriba se ha dicho. Debe entenderse que, además de usar luz ultravioleta y mostaza nitrogenada separadamente en procedimientos para obtener razas de *A. griseus* de alto rendimiento, las dos cosas pueden usarse alternativa o intermitentemente en el desarrollo gradual de mutantes de *A. griseus* de alto rendimiento.

El ejemplo siguiente ilustra los procedimientos usados para obtener mutantes de *A. griseus* de alto rendimiento.

10 EJEMPLO I.

Se seleccionó una raza de partida, A, de *A. griseus* que se había desarrollado de la raza de Waksman n° 4 hasta un punto de resistencia de por lo menos 500 microgramos/ml de estreptomina por el procedimiento de McDaniel, y que producía 250 microgramos/ml de estreptomina, en condiciones de aireación sumergida, en un medio de la siguiente composición:

| | | |
|----------------|------|--------|
| Harina de soya | 20.0 | gr. |
| Dextrosa | 10.0 | gr. |
| Cloruro sódico | 10.0 | gr. |
| Agua destilada | 1 | litro. |

25 Esporas de esta raza se suspendieron en agua y se expusieron a luz ultravioleta de longitud de onda de 2,537 Å a distancia de unos 25 cm. durante 12 minutos, tiempo en el cual murieron aproximadamente el 99 % de las esporas. Luego las sobrevivientes se pusieron en placas sobre extracto de levadura y agar de dextrosa, y las colonias de actinomicetos individuales que se desarrollaron se transfirieron a tubos de



12

19

187020

ensayos oblicuos de agar de la misma composición y se dejaron esporular. Las esporas desarrolladas se usaron luego para inocular frascos que contenían un agente nutritivo de la composición siguiente:

6

| | |
|----------------|----------|
| Harina de soya | 20.0 gr. |
| Dextrosa | 10.0 gr. |
| Cloruro sódico | 10.0 gr. |
| agua destilada | 1 litro |

10

y los agentes inoculados se incubaron a 28°C. en condiciones de aireación sumergida durante 3-5 días y luego se ensayaron en cuanto al contenido de estreptomycin. Varias de estas mezclas mostraron un rendimiento de estreptomycin considerablemente más alto que los 250 microgramos/ml de la raza de partida. Sin embargo, para el desarrollo ulterior se seleccionó una raza B, que mostraba un rendimiento de 400 microgramos/ml.

15

Una cantidad de esporas de la raza B se suspendieron en una solución neutralizadora de fosfato a pH 8.0 que contenía $(\text{ClCH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}$, en una concentración 0.005N, durante 30 minutos. Las esporas sobrevivientes se transfirieron

20

luego a agar nutritivo como antes se describe, las colonias de actinomicetos que se desarrollaron se transfirieron a tubos de ensayo inclinados con agar con la esporulación y las esporas así desarrolladas se usaron para inocular frascos de agente nutritivo de la composición siguiente:

25

| | |
|----------------|----------|
| Harina de soya | 20.0 gr. |
| Dextrosa | 10.0 gr. |
| Cloruro sódico | 10.0 gr. |
| agua destilada | 1 litro. |



12F3

187020

La incubación de los frascos inoculados durante 3.5 días a 28°C., en condiciones de aireación sumergida, y el ensayo en cuanto al contenido de estreptomina revelaron una raza transformada, C, que produjo 500 microgramos/ml, y una raza D, que produjo 550 microgramos/ml. Aunque la formación de las razas C y D mostró una mutación definida del organismo en la dirección deseada, aparentemente, habían aparecido también cambios en los organismos porque la capacidad de dichas razas para producir altos rendimientos de estreptomina disminuyó en un período de tiempo.

La raza B se colocó luego en placas y se seleccionaron colonias individuales. Una de estas colonias seleccionadas, que mostraba capacidad productora de estreptomina más alta que el cultivo de la raza primitiva B, se designó como raza E y constantemente rindió 550 microgramos/ml de estreptomina, la raza E se trató a su vez de igual modo con luz ultravioleta y de unos 150 aislados que se propagaron y enegaron, se obtuvieron tres razas que producían constantemente 800 microgramos/ml de estreptomina propagados en condiciones de aireación sumergida en un medio de la siguiente composición:

| | | |
|--------------------------------|------|--------|
| Harina de soya | 20.0 | gr. |
| Dextrosa | 10.0 | gr. |
| Cloruro sódico | 10.0 | gr. |
| Solubles secos de destiladores | 2.5 | gr. |
| agua destilada | 1 | litro. |

El aumento total de la raza E que producía 250 microgramos/ml a las capaces de producir 800 microgramos/ml



1.25 49

187020

se realizó después de haberse ensayado unos 3000 aislados. La raza de rendimiento más alto, así obtenida, se ha llamado *A. griseus* Dulaney L-118.

5 Las características de cultivo de la nueva raza, *A. griseus* Dulaney L-118, se consignan en los cuadros siguientes y se comparan con los datos dados para el *A. griseus* en la quinta edición del Manual of Determinative Bacteriology de Bergey y con las características de cultivo de la raza de *A. griseus* Waksman n° 4.

10 CUADRO I.

Características de cultivo de *A. griseus*

| | <u><i>A. griseus</i></u> ----- | <u><i>A. griseus</i></u> <u>Waksman n° 4</u> | <u><i>A. griseus</i></u> <u>Dulaney L-118</u> |
|------------------------|--|--|--|
| Filamentos Conidios | ramificación, unas cuantas espirales en varilla a cilíndricas cortas 0.8 x 0.8 a 1.7 micras. | ramificación de acuerdo | ramificación de acuerdo |
| gelatina barra | crecimiento superficial verdoso-amarillo o color crema, matiz parduzco, licuación rápida | Crecimiento superficial gris, licuación rápida. | Fuerte crecimiento superficial gris, licuación rápida |
| agar sintético | Micelio aéreo, delgado, incoloro, esparcido, color ante acéitunado, polvo, verde mar | De acuerdo de acuerdo, salvo color verdoso-gris | De acuerdo de acuerdo, salvo color verdoso-gris. |
| agar fecula | Delgado, difuso, transparente | Delgado-transparente | Delgado-transparente. |
| agar dextrosa | Elevado en el centro, radiado color crema a naranja, margen roído | Puntiforme colonias color crema más tarde unidas y arrugadas | Puntiforme colonias color crema más tarde unidas y arrugadas |
| agar liso | Abundante, color crema, casi transparente | abundante, blanco tirando a gris | abundante, blanco tirando a gris |



12 49

187090

CUADRO I (Continuación)

| | <u>A. griseus</u> ----- | <u>A. griseus</u> <u>Waksman n°4</u> | <u>A. griseus</u> <u>Dulaney L-118</u> |
|--|---|---|--|
| Caldo de dextrosa | Abundante, película amarillenta con matiz verdosa, muy deblada | De acuerdo | De acuerdo |
| Lechada tomacol | anillo crema coagulado con rápida peptonización, volviéndose alcalino | peptonización alcalino | peptonización alcalino |
| Patata | amarillento, arrugado | crecimiento gris muy grande | crecimiento gris muy grande |
| Reducción | nitritos no producidos de nitratos | reducción ligera | reducción muy ligera |
| Acción proteolítica | actividad proteolítica en leche y gelatina | de acuerdo | de acuerdo |
| Pigmento | no soluble | de acuerdo | de acuerdo |
| Pécula | hidrolizado | de acuerdo | hidrolizado |
| Tensión oxígeno | aróbico | de acuerdo | de acuerdo |
| Utilización azúcar | no consignados | véase cuadro II | Véase cuadro II |
| Susceptibilidad a actinofagia para las razas de A. griseus de Waksman. | no consignado | susceptible | susceptible |
| Producción de estreptomina | no consignado (el cultivo tipo no produce estreptomina) | 400 microgramos/ml agente harina soya | 800-1600 microgramos/ml agente harina soya |
| Resistencia a la estreptomina | no consignado | véase cuadro III | Véase cuadro III |

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL



187020

CUADRO II

Utilización de azúcar por A. griseus (1)

| AZÚCARES | <u>A. griseus</u> <u>Waksman n° 4</u> | <u>A. griseus</u> <u>Dulacoy L-118</u> |
|------------------|--|---|
| 5 Glucosa ----- | + | + |
| Levulosa ----- | + | + |
| Arabinosa ----- | + | + |
| Xilosa ----- | + | + |
| Manosa ----- | + | + |
| Galactosa ----- | + | + |
| 10 Ranosa ----- | - | - |
| Sorbosa ----- | - | - |
| Sucrosa ----- | - | - |
| Lactosa ----- | + | + |
| Celobiosa ----- | + | + |
| 15 Maltosa ----- | + | + |
| Refinosa ----- | - | - |
| Inulina ----- | - | - |
| Dextrina ----- | + | + |
| Salicina ----- | - | - |

20 (1) 0.05 % de azúcar en base de caldo nutritivo. Consig-
nado como + si 25 % o más de azúcar se utilizó en tres días
de crecimiento sumergido. Confirmado en agente sintético
(NH₄)₂HPO₄, a excepción de la arabinosa que tampoco soporto
el crecimiento.



12F

187020

CUADRO III.

(1)

Resistencia de *A. griseus* a la estreptomina

Microgramos estreptomina
por ml agar

crecimiento en rayas
A. griseus
Waksman n°4

A. griseus
Dulaney L-118

| Microgramos estreptomina por ml agar | <i>A. griseus</i> Waksman n°4 | <i>A. griseus</i> Dulaney L-118 |
|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 0 | H + | H + |
| 2 00 | H + | H + |
| | 0 | 1 + |
| 4 00 | 0 | 1 + |
| | 0 | 1 + |
| 6 00 | 0 | 2 + |
| | 0 | 0 |
| 8 00 | 0 | vestigios |
| | 0 | 0 |
| 16 00 | 0 | 0 |
| | 0 | 0 |

(1) método rayas agar, inócuile esperas.

Los estados anteriores indican claramente que la nueva raza, *A. griseus* Dulaney L-118 se caracteriza definitivamente por ser una raza de *A. griseus* y además una raza diferente y definida por virtud de su alta producción de estreptomina y su alta resistencia a la misma.

Incluso rendimientos más altos de estreptomina pueden obtenerse prepagando *A. griseus* Dulaney L-118 y otras razas de alto rendimiento en agentes que favorecen particularmente el crecimiento y la elaboración de estreptomina de dichas razas. Esto se representa claramente en el siguiente ejemplo:



187020

EJEMPLO II.

Se prepararon agentes de fermentación de la composición siguiente:

| | Componente | Agente A | Agente B |
|----|--------------------------------|----------|----------|
| 5 | Harina de soya | 2 % | 2.5 % |
| | Dextrosa | 1 % | 1.5 % |
| | Solubles secos de destiladores | 0.5 % | 0.75 % |
| | NaCl | 0.25% | 0.25 % |
| 10 | agua hasta 100% | | |

Frascos que contenían estos agentes se inocularon con un crecimiento vegetativo de *A. griseus* Dulaney L-118 obtenido en el ejemplo I, y los agentes inoculados se incubaron a 28°C. en condiciones de aireación sumergida durante 3-5 días. A este tiempo, los ensayos mostraron que los medios fermentados o caldes contenían 900-950 microgramos/ml de estreptomicina en el caso del agente A y aproximadamente 1100 microgramos/ml en el caso del agente B.

Rendimientos de orden comparable se han obtenido por fermentación aireada sumergida empleando los mismos medios, y conducida en escala de una instalación piloto en fermentadores de unos 6000 litros de capacidad, y en escala de instalación en fermentadores de unos 60000 litros de capacidad.

Aunque los agentes empleados en el ejemplo II se inocularon con un crecimiento vegetativo de *A. griseus* Dulaney L-118 debe entenderse que se obtienen resultados similares empleando como inóculo una suspensión de esporas de *A. griseus* Dulaney L-118.



12 FEB. 1948

187020

Esta solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 14 de febrero de 1948, bajo el número 8.308, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto de Propiedad Industrial.

5

- N O T A -

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

- 10 1º.- Un procedimiento que comprende someter una raza de *A. griseus* resistente a la estreptomycin a la acción de un agente transformador en condiciones tales que la mayoría de las esporas se mueran, sembrar las esporas sobrevivientes en placas de agar nutritivo, transferir colonias de actinomicetos desarrollados en agar nutritivo a tubos de ensayo
- 15 inclinados de agar para la esporulación, prepagar las esporas así desarrolladas en agentes nutritivos separados durante unos 3-4 días, y ensayar los agentes fermentados en cuanto al contenido de estreptomycin; seleccionar una raza que ofrezca un rendimiento de estreptomycin por lo menos de 40-50%
- 20 más alto que la raza madre resistente, y repetir el tratamiento con un agente mutante, siguiendo a esto la siembra, esporulación, propagación, ensayo y selección para desarrollar las razas de *A. griseus* transformadas de rendimiento más



MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

187020

alto para desarrollarlas hasta que se obtiene una mutante que constantemente ha de producir por lo menos 800 microgramos/ml de estreptomocina al propagarse en un agente nutritivo, con condiciones de aireación sumergida.

5 2º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 1º, en el cual el agente transformador es el rayo ultravioleta.

10 3º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 1º en el cual el agente transformador es mostaza de nitrógeno.

15 4º.- Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1º a 2º en el cual el cultivo inicial es una raza de *A. griseus* que crece en un medio nutritivo que contenga una concentración inicial de estreptomocina de por lo menos 500 microgramos/ml.

20 5º.- Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1º a 4º, que incluye preparar estreptomocina propagando en un medio nutritivo acuoso en condiciones de aireamiento sumergidas, dicha raza producida por el procedimiento reivindicado en los puntos 1º a 4º.

6º.- Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1º a 5º que incluye la preparación de estreptomocina propagando en un medio nutritivo acuoso, en condiciones de aireación sumergida, el organismo *A. griseus* Dulzney L-118.

25 7º.- Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1º a 6º que incluye preparar estreptomocina inoculando un agente nutritivo acuoso con un crecimiento vegetativo de *A. griseus* Dulzney L-118, e incubando el medio inoculado a temperatura de unos 28°C. en condiciones de aireación sumergida.

12



187020

5 8º.- Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1º a 6º que incluye preparar estreptomicina inoculando un agente nutritivo acuoso con una suspensión de esporas de *A. griseus* Dulaney L-118 e incubar el agente inoculado a temperatura de unos 28°C en condiciones de aireación sumergida.

10 9º.- Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1º a 8º que incluye preparar estreptomicina en rendimientos de 900-1100 microgramos/ml de agente fermentado propagado en condiciones de aireación sumergida en un agente nutritivo acuoso que tiene aproximadamente 2-2,5 % de harina de soya, 1-1,5% de dextrosa, 0,5-0,75 % de solubles secos de destiladores y 0,25 % de NaCl, una raza de alto rendimiento de *A. griseus*; caracterizada como resistente a una concentración inicial de estreptomicina de por lo menos 500 microgramos/ml, y caracterizada además por la producción constante de por lo menos 800 microgramos/ml de estreptomicina.

15 10º.- Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1º a 9º que incluye preparar estreptomicina en rendimientos de 900-1100 microgramos/ml de agente fermentado propagado el organismo *A. griseus* Dulaney L-118 en condiciones de aireación sumergida en un agente nutritivo acuoso que contiene aproximadamente 2-2,5 % de harina de soya, 1-1,5 % de dextrosa, 0,5-0,75 % de solubles secos de destiladores y 0,25 % de NaCl .

20 25 11º.- Un procedimiento según se reivindica en los puntos 9º y 10º, en el cual dicha raza es un crecimiento vegetativo de *A. griseus* Dulaney L-118.



187020

12º.- Un procedimiento según se reivindica en los puntos 9º y 10º, en el cual dicha raza es una suspensión de esporas de *A. griseus* Duieney 1-118.

5 13º.- Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1º a 12º, en el cual la deseada raza *A. griseus* se obtiene sometiendo *A. griseus* Waksman nº 4 a la acción del agente transformador.

14º.- Un procedimiento virtualmente como arriba se describe:

10 15º.- Un procedimiento para la preparación de antibióticos.

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

15 Esta memoria consta de diecisiete hojas escritas por una sola cara:

Madrid, 11 MAY. 1949
P. A.

Alberto de Elzaburu

Por Poder

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

Cn/-