

1878 10



13 ABR. 1949

1878 10

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, entidad norteamericana, establecida en 126 East Lincoln Avenue, Rahway, Nueva Jersey, Esta-dos Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO DE PREPARAR ESTREPTOMICINA".

-o-

Este invento se refiere, en general, a la producción de antibióticos y, más particularmente, a la preparación de estreptomina por propagación de Actinomyces griseus inmunizado al actinofago.

5

En la preparación de estreptomina por procesos de fermentación, tales como, por ejemplo, por propagación de Actinomyces griseus en un medio conveniente se ha observado con frecuencia que el proceso de fermentación se interrumpe prematuramente con lo cual cesa la producción de estreptomina. Esta interrupción brusca se conoce como "interrupción

10



prematura".

Se ha propuesto vencer esta seria dificultad por alteraciones del medio y por cambios en las condiciones de cultivo. Sin embargo, estos esfuerzos han carecido por completo de éxito. En una tentativa para asegurar una raza más fuerte y más resistente de Actinomyces griseus se desarrollaron mutaciones por radiaciones ultra-violeta. Estos cultivos, aunque variando mucho en su capacidad de producción de estreptomicina, seguían siendo susceptibles a una interrupción prematura del proceso de fermentación.

Se ha comprobado ahora que esta interrupción es debida a destrucción celular determinada por un actinófago que se multiplica a expensas de razas vivientes, productoras de estreptomicina, de Actinomyces griseus. Las micrografías al microscopio electrónico de cultivos de Actinomyces que contienen el actinófago ahora descubierto, han mostrado la existencia de un gran número de cuerpos particulados con una cabeza redondeada de unos 0.05 micrones de diámetro y una cola de 0.015 x 0.15 micrones. Este actinófago es un virus microbiológico filtrable que infecta específicamente razas de Actinomyces griseus e inicia la destrucción de las células jóvenes. Este actinófago es transmisible y se multiplica siguiendo a una transferencia a un nuevo cultivo de Actinomyces griseus. Filtrando el cultivo después de 24 horas y añadiendo el filtrado a un cultivo reciente, puede observarse la propagación del actinófago. Los filtra-

dos de cada cultivo pueden inocularse a placas por el método correspondiente para la determinación del actinófago. Por cada partícula aislada formadora de placas añadida al primer cultivo de Actinomyces griseus en esta serie, se había producido un total de  $75 \times 10^{20}$  partículas a la sexta transferencia.

La tabla siguiente muestra la multiplicación del actinófago.

TABLA I

Multiplicación de actinófago

Transferencia	Actinófago por ml.	Factor de multiplicación	
		Transferencias individuales	Acumulativo
Inóculo de actinófago	20.000.000.000	-	-
Primera transferencia	32.800.000.000	8.200	8.200
Segunda transferencia	100.000.000.000	16.000	$131 \times 10^6$
Tercera transferencia	36.000.000.000	1.800	$236 \times 10^9$
Cuarta transferencia	48.000.000.000	6.600	$156 \times 10^{13}$
Quinta transferencia	64.000.000.000	6.600	$10^3 \times 10^{17}$
Sexta transferencia	9.600.000.000	735	$75 \times 10^{20}$
<u>A. griseus</u> de control	< 10		

Se ha descubierto ahora que es posible conducir la propagación de Actinomyces griseus de tal modo que se obtenga una raza resistente que puede hacerse inmune al ataque por el



1878 10

actinófago.

Así, el invento se refiere también al aislamiento y cultivo de razas de Actinomyces griseus que son inmunes al ataque por el actinófago y que son también capaces de producir estreptomina con rendimientos satisfactorios.

Al llevar a la práctica el procedimiento nuevo y perfeccionado en una forma preferida, se incuban células o esporas de Actinomyces griseus en un medio nutritivo que contiene actinófago. Debido al crecimiento actinófago todas las células que sean susceptibles de ataque por el actinófago son destruidas creando así condiciones favorables para la multiplicación de las células resistentes al actinófago. Estas células resistentes se desarrollan en grandes cantidades y pueden aislarse por procedimientos microbiológicos convencionales. Al transferir las células resistentes al actinófago a un nuevo medio nutritivo, el crecimiento de las células resistentes es todavía incrementado al paso que el actinófago no puede aumentar en número en presencia de Actinomyces griseus resistentes. Por transferencia repetida de células resistentes al actinófago a nuevos medios nutritivos adecuados, se preparó un cultivo de Actinomyces griseus completamente libre de actinófago. Las nuevas células resistentes pueden propagarse en presencia de actinófago sin destrucción. Los cultivos de Actinomyces griseus resistentes al actinófago han resultado diferir en su capacidad de producción de estreptomina. Por consiguiente, para su utili-



1878 10

zación práctica, se aísla cierto número de cultivos resistentes al actinófago y se ensayan para su producción de estreptomomicina. Aquéllas razas que son equivalentes al control se seleccionan como razas de reserva para la producción de estreptomomicina. Los cultivos de Actinomyces griseus resistentes al actinófago han demostrado ser particularmente adecuados para la producción industrial en gran escala de estreptomomicina. Siguiendo a la iniciación de cultivos resistentes al actinófago en grandes tandas, no se han observado casos de interrupción prematura debida al actinófago, mientras que la producción de estreptomomicina en grandes rendimientos se mantuvo durante largos períodos de funcionamiento de la instalación.

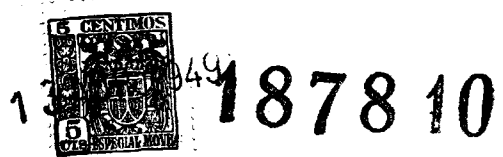
Los ejemplos siguientes ilustran un método de realizar el presente invento, pero ha de entenderse que estos ejemplos se dan a modo de ilustración, y no de limitación.

EJEMPLO I

Se preparó un medio nutricio que contenía lo siguiente:

20	Extracto de carne . . . . .	0.3 %
	Dextrosa . . . . .	1.0 %
	N-Z-Amina (caseína digestiva triptica) . . . . .	1.0 %
	Cloruro de sodio . . . . .	1.0 %
	Agar . . . . .	2.0 %
25	Agua hasta 100%	

Se desarrollaron cultivos resistentes de cultivo A de Actinomyces griseus rayando sobre placas de agar las colonias resistentes que se desarrollan sobre la superficie de



un cultivo sumergido parcialmente destruido por actinófago, siguiendo a otra incubación en cultivo estacionario. También se desarrollaron cultivos resistentes rayando cultivo de Actinomyces griseus sobre placas de agar que contenían actinófago.

Se compuso un medio que contenía lo siguiente:

- Extracto de carne . . . . . 0.3 %
- Dextrosa . . . . . 1.0 %
- N-Z-Amina (caseína digestiva triptica). . . . . 1.0 %
- Cloruro de sodio . . . . . 1.0 %
- Agua hasta 100 %

El medio se subdividió en matraces Erlenmeyer que se taparon con algodón. El matraz y el contenido se esterilizaron luego a 120° C durante 30 minutos. Después de esterilización los matraces se enfriaron y se inocularon con porciones de las rayas de colonias resistentes. Los matraces se colocaron sobre una máquina agitadora rotativa de 63 mm. de amplitud y 220 r.p.m. que proporciona agitación constante y aireación y se incubaron a 28° C. También se rayaron porciones de cada inóculo sobre agar más fago y se incubaron a 28° C. La tabla siguiente muestra los resultados de los diferentes cultivos:

Cultivo	Crecimiento con fago		Unidades de actividad por ml. de caldo fermentado.			
	Placa	Líquido	Control		+ Fago	
		sumergido	3 días	4 días	3 días	4 días
Matraz n°. 1 - colonia resist. A	++	++	51	105	54	75
Placa n°. 2 - colonia resist. A	++	++	< 30	78		
			42	84	60	90
Placa n°. 3 - colonia resist. A	++	++		< 30		< 30
Placa n°. 4 - faja resist., pero que contiene cas	++	++	87	210	195	195
Control A	-	-	60	117	< 30	< 30
			87	129		



13

1878 10

EJEMPLO 2

Se compuso un medio que contenía lo siguiente:

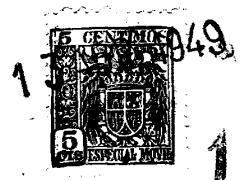
N-Z-Amina (caseína digestiva triptica) . . . . .	1.0%
Dextrosa . . . . .	1.0%
Extracto de carne . . . . .	0.3%
Cloruro sódico . . . . .	1.0%
Agua ha-sta 100%	

El medio se trató como en el Ejemplo 1 y el inócu-  
 lo se preparó a partir de colonias resistentes de A de las  
 fajas del Ejemplo 1 y de colonias resistentes adicionales de  
 varios cultivos transferidos a cultivos inclinados. Los cul-  
 tivos inclinados se usaron para inocular el medio. Se prepa-  
 ró un juego con 0.1 cc. de filtrado de fago. Los matraces se  
 incubaron a 30° sobre una máquina agitadora rotativa de 63 mm.  
 de amplitud y 220 r.p.m. Se obtuvieron los resultados siguien-  
 tes:

Unidades de actividad por ml. de caldo fermentado

Cultivo	3 días		4 días	
	Control	+ filtrado	Control	+ filtrado
Control A	159,219	< 30	210	< 30
Aislado A - 1	51,45	< 30	57,57	< 30
Aislado A - 2	111,120	276	102,54	114
Aislado A - 3	159,120	288	177,165	264
Aislado A - 4	254,318	420	216,261	300
Aislado A - 5	114,<30	<30	111,<30	<30
Aislado A - 6	111,309	345	96,390	264
Aislado A - 7	279,375	93	228,300	150
Aislado B - a	<30,<30	<30	<30,<30	<30
Aislado B - b	<30,<30	<30	<30,<30	<30
Aislado C - a	144,138	111	63,58	57
Aislado C - b	126,123	78	81,159	72
Aislado D - a	42,84	87	36,87	45
Aislado D - b	89,81	87	57,57	48
Aislado E - a	<30,<30	<30	33,<30	42
Aislado A - a	237,396	159	210,339	204
Aislado A - b	219,219	198	174,159	165
Aislado F - a	<30,<30	<30	<30,<30	<30
Aislado G - a	93,171	159	59,141	141
Aislado G - b	81,144	<30	81,519	<30
Aislado H - a	102,117	<30	114,120	42
Aislado H - b	159,<30	78	162,33	99

\* matraces duplicados



1878 10

EJEMPLO 3

Se preparó un medio que contenía:

Harina de habas de soja . . . . .	2 %
Dextrosa . . . . .	1 %
Solubles de destilería (SVP) . . . . .	0.5%
Cloruro de sodio . . . . .	0.25%
Agua hasta 100%	

Este medio se preparó como se ha mostrado en los Ejemplos 1 y 2 y se inoculó con los cultivos resistente y de control mencionados luego con un inóculo de suspensión de esporas.

A una serie de todos los cultivos se añadió 0.1 cc. de fago como se muestra a continuación:

Unidades de actividad por ml. de caldo fermentado en matraces duplicados.

15  
20  
25  
30

<u>Cultivo.</u>	<u>3 días</u>	<u>4 días</u>
Control I	92,102	108,84 *
Control I + fago	< 50, < 50	< 50, < 50 **
Control A	102,72	84,63 *
Control A + fago	< 50, < 50	42, 50 **
Aislado A 4	87,75	84,63
Aislado A 4 + fago	72,84	57,74
Aislado A 6	48,78	39,66
Aislado A 6 + fago	81,99	66,63
Aislado A 7	48,108	60,75
Aislado A 7 + fago	138,135	108,84
Aislado A a	108,72	99,45
Aislado A a + fago	99,78	48,93
Aislado A b	84,99	60,63
Aislado A b + fago	81,72	63,57

\* 0.1 cc. no produjo placas  
\*\* 0.1 cc. produjo 1000 placas

Pueden introducirse modificaciones en la reali-



1878 10

zación del presente invento sin apartarse por ello del espíritu y del alcance del mismo, y el invento ha de limitarse solamente por las reivindicaciones anejas.

5 Esta solicitud, que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 15 de Abril de 1948, bajo el Número 21.305, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto Ley sobre Propiedad Industrial.

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

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

15 1º. Un procedimiento para la recuperación de estreptomicina con grandes rendimientos, que comprende propagar razas de Actinomyces griseus que previamente se han inmunizado al actinófago.

2º. Un procedimiento para la recuperación de estreptomicina con grandes rendimientos, que comprende propagar razas de Actinomyces griseus resistentes al actinófago en un medio nutricio sometido a agitación y aireación.

20 3º. Un procedimiento para la recuperación de estreptomicina, que comprende propagar razas de Actinomyces griseus



1949 1878 10

resistentes al actinófago, en un medio nutricio estacionario.

4º. Un procedimiento para la recuperación de estreptomicina, que comprende cultivar razas de Actinomyces griseus en presencia de actinófago, transferir las células resistentes a un nuevo medio de cultivo, y someter dicho medio de cultivo a agitación y aireación.

5º. Un procedimiento para producir Actinomyces griseus resistente al actinófago, que comprende propagar razas de Actinomyces griseus en un medio nutricio que contiene actinófago, transferir las células resistentes a un nuevo medio de cultivo y repetir dicha transferencia a nuevos medios hasta que el actinófago esté virtualmente eliminado.

6º. Un procedimiento de preparar estreptomicina. Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y para los fines que se han especificado.

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

Madrid a

13 ABR. 1949

P. A.

Alberto de Elzaburu

Per Poder

M/L/L.