



388020

388020

SECCIÓN TÉCNICA  
REGISTRACIONES S. R. L.  
CLASE AGI  
SUBCLASE K

812  
K

## MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: MORISHITA PHARMACEUTICAL Co. Ltd., de  
nacionalidad japonesa

RESIDENCIA: 29- 4- Cheme , Dosho- Machi Higashi-Ku

OSAKA- City, OSAKA Prefecture (JAPON)

Inventor: TSUNEO MEGURO que cede sus derechos a la  
empresa solicitante

ENUNCIADO: "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UNA  
DROGA BACTERIO-LACTICA".

Prioridad: Patente \_\_\_\_\_ n.º \_\_\_\_\_ del \_\_\_\_\_

IV/GU-637

388020



1 La presente memoria descriptiva tiene como  
fin la declaración del objeto sobre el que ha de recaer el pri  
vilegio de explotación industrial y comercial exclusivo en el  
territorio nacional, de una Patente de Invención, de acuerdo  
5 con la vigente Legislación sobre Propiedad Industrial, que co  
mo el enunciado indica se trata de "PROCEDIMIENTO DE PREPARA  
CION DE UNA DROGA BACTERIO-LACTICA".

El presente invento se refiere a un proceso  
para producir una droga bacterio-láctica que tiene resisten  
10 cia contra varios antibióticos y sulfa-drogas.

Recientemente, de acuerdo con el desarrollo  
de los antibióticos, la quimioterapia ha venido a ser aplica  
ble también a la terapia de las epidemias digestivas y se  
muestra con efectos terapéuticos sobresalientes; sin embargo,  
15 por otra parte, el uso impropio de los antibióticos, causa  
la aparición de bacterias disentéricas resistentes, incremen  
ta la superinfección y disminuye las bacterias útiles en el  
intestino.

Por lo tanto, en años recientes, el trata  
20 miento de "droga bacterio-láctica" iniciado por Metchnikov,  
vuelve otra vez a ser aplicable a la terapia y prevención de  
epidemias digestivas, tales como la disenteria, salmonellosis  
y otras, como la superinfección; los efectos de este trata  
miento son ampliamente conocidos.

25 Sin embargo, desde que la bacteria láctica,  
que es usada para la convencional "droga bacterio-láctica" es  
sensible a los antibióticos, hay una desventaja que la  
lleva a ser terapéuticamente inefectiva cuando la convencional  
"droga bacterio-láctica" ha sido usada simultáneamente con  
30 los antibióticos en quimioterapia.



1

Uno de los objetos del presente invento es proveer una "droga bacterio-láctica" resistente a múltiples drogas, que comprende una bacteria láctica que no pierde la actividad cuando se usa simultáneamente con varias clases de antibióticos y sulfa-drogas.

5

Otro de los objetos del invento es obtener la bacteria láctica que posee una amplia variedad de resistencia contra varias clases de antibióticos y sulfa-drogas.

10

Los otros objetos y efectos de dicha invención pueden ser definidos a partir de las explicaciones siguientes.

15

Nosotros inventamos previamente el método de obtención de una droga que comprende una cepa de Streptococcus-faecalis B10-SMR, la cual es una bacteria láctica que tiene resistencia a la streptomina, como una "droga bacterio-láctica que posee resistencia contra los antibióticos" (Patente japonesa N° 567.370).

20

Sin embargo, desde que hay muchas oportunidades en la quimioterapia reciente de que más de dos clases de antibióticos y sulfa-drogas, sean empleadas simultáneamente, dicha "droga bacterio-láctica" que posee resistencia contra una clase específica de antibiotico como se instruye en la mencionada patente japonesa, tienen desventajas por sus pobres resultados prácticos.

25

Hemos encontrado que los siguientes requerimientos deben ser satisfechos para obtener que la "droga bacterio-láctica" muestre un valor medicinal suficiente cuando es usada simultáneamente con varias clases de antibióticos y sulfa-drogas.

30

Primeramente es necesario tener la bacteria

-4- 388020



1 láctica en droga bacterio-láctica que mantiene una resisten-  
cia bajo la presencia simultánea de varias clases de antibió-  
ticos y sulfa-drogas. Esto es, que dicha bacteria láctica debe  
5 ser de resistencia simultánea a varias drogas. De acuerdo con  
esto, es necesario seleccionar la bacteria láctica que tenga  
la característica de llegar a ser resistente simultáneamente  
a dos o más diferentes clases de antibióticos, así como evitar  
casos tales como el siguiente: cuando la bacteria láctica se  
convierte en resistente a la streptomina, es difícil que lle-  
10 gue a ser resistente contra otros antibióticos, o cuando la  
bacteria láctica se hace resistente a otros antibióticos dife-  
rentes de la streptomina, su capacidad de resistencia ante  
la streptomina decae en cierto grado.

15 Segundo, es necesario para la bacteria láctica, que tiene resistencia ante drogas, no poseer la transmisibilidad de esta resistencia. La razón de ello es que cuando tal bacterio-droga láctica, poseyendo transmisibilidad de resistencia es dada al paciente, los gérmenes de virus y colitis existentes en el intestino, se convierten todos ellos en resis-  
20 tentes y por lo tanto ocasionan una mala influencia sobre la  
terapia del paciente.

25 En tercer lugar, es necesario para la bacteria láctica que tiene resistencia a la droga, mostrar una resistencia estable y no poseer una dependencia ante otras drogas particulares. La razón es que, aún si la bacteria láctica ha obtenido resistencia contra varios tipos de antibióticos y sulfadrogas, pierde valor como droga si su resistencia desaparece fácilmente, y la bacteria láctica, teniendo resistencia ante drogas particulares, tales como la streptomina, muestra  
30 una dependencia a la streptomina, y como resultado, es pro-



1 prensa a requerir streptomycin como una indispensable substan-  
cia para su crecimiento, trayendo así la necesidad de añadir  
antibiótico, mostrando una dependencia al medio y obligando a  
la prescripción de streptomycin al tiempo del cultivo y admi-  
5 nistración de tal bacteria láctica.

Por último, como cuarto punto, es necesario  
para la bacterio-droga láctica, estar en forma de droga pulve-  
rulenta y estable, después del cultivo de la droga bacterio-  
láctica así que el índice del crecimiento de la bacteria lác-  
10 tica en el medio del cultivo debe ser alto. En general, la  
bacteria láctica que llegó a ser resistente contra las drogas,  
muestra un señalable declive de índice de crecimiento en el  
medio del cultivo, por lo tanto, es necesario seleccionar la  
bacteria láctica, cuyo índice de crecimiento no decline a cau-  
15 sa de la resistencia a la droga.

Como resultado de nuestra investigación re-  
lativa a la selección de la bacteria láctica que satisfaga  
los cuatro puntos anteriormente mencionados, y al método de  
proveer resistencia a la bacteria láctica contra varias clases  
20 de drogas, hemos encontrado que la bacteria láctica que incorpo-  
ra los cuatro puntos mencionados anteriormente de requerimientos  
y muestra resistencia contra los siguientes antibióticos y va-  
rias sulfa-drogas, puede ser derivada de los métodos anterior-  
mente mencionados: dichos métodos comprenden la selección de  
25 una cepa que tenga resistencia contra las sulfa-drogas, a par-  
tir del conjunto de las cepas de bacterias lácticas pertenecien-  
te al Streptococcus faecalis y cultivando dicha cepa en cada  
medio, conteniendo sucesivamente streptomycin, (de aquí en a-  
delante abreviado como en SM) cloranfenicol (CM), tetraciclina  
30 TC, eritromicina (EM), y aminobenzoil-penicilina (ABPC) res-



1 pectivamente, de tal manera que dicha cepa es repetidamente  
cultivada en cada medio conteniendo los antibióticos menciona  
dos anteriormente en el orden SM, CM, TC, EM, ABPC, usando  
"método de fabricación de droga en placa de agar gradual y téc  
5 nica de transferencia repetida en presencia de concentraciones  
subinhibidoras, de un antibiótico," en combinación de ella,  
para proveer la resistencia contra estas drogas para las cepas;  
de acuerdo con tal método, dicha cepa viene a obtener resis  
tencia contra Kanamicina, fradiomicina, Oleandomicina, Gentami  
10 cina, Spiramicina, Bicilina, Sincilina, Oracilina, Stafcilina  
V, Metocilina, S, Stafcilina A y Natacilina, junto con SM, CM,  
TC, EM, y ABPC.

La cepa madre, que es empleada de acuerdo  
con el invento para la derivación de la bacteria láctica que  
15 tiene resistencia contra varios tipos de antibióticos y sulfa  
drogas, es una bacteria resistente a la sulfa-droga pertene  
ciente al Strptococcus faecalis, como se menciona anteriormen  
te, y es designada por cepa BIO (Patente japonesa N° 67,370).

El método para permitir que dicha cepa BIO  
20 llegue a ser resistente a las anteriores clases de antibióti  
cos, comprende los pasos de:

a.- Cultivando por el "método de las vetas",  
dicha cepa en un medio de lactosa, carbonato calcio precipi  
tado y agar (en adelante se designará como Ca la) conteniendo  
25 SM por 72 horas a 37° C. de temperatura, por medio del "método  
de fabricación de droga en placa de agar gradual".

b.- Seleccionando varias colonias crecidas  
sobre el lugar que tiene la más alta concentración de SM de las  
que crecen por encima del plato, e inoculando cada una de di  
30 chas colonias al medio Ca la , conteniendo más alta concentra



1 ción de CM para su cultivo por el "método de las vetas".

5 c.- Cultivando por sucesivas transferencias dicho cultivo, más de 16 ó 17 veces, por el método de "técnica de transferencia repetida en presencia de concentración subinhibidora de un antibiótico (SM)".

De acuerdo con dicho método, se puede obtener la cepa BIO, poseyendo alta resistencia contra SM.

10 Siguiendo de la misma manera, se llevan a cabo repetidamente los cultivos de transferencias sucesivas para CM, TC, EM, ABPC, empleando "método de fabricación de droga en placa de agar gradual "y" técnica de transferencia repetida en presencia de concentraciones subinhibidoras de un antibiótico", entonces se puede obtener la bacteria láctica con múltiple resistencia a las drogas, para ser usada, en el asunto del invento. Hemos designado dicha bacteria láctica como 15 cepa BIO- 4R. Esta cepa ha sido depositada en la agencia de "Ciencia Industrial y Tecnología, Instituto de Investigación de Fermentos" que es la institución autorizada para el depósito de bacterias de Japón con el número 184. Llevando a cabo 20 el cultivo de sucesivas transferencias, 30 ó 40 transferencias de cultivos son aplicadas en caso de que sea CM, 40 a 50 con TC, cerca de 16 a 17 con EM, y de 20 a 30 con ABPC; entonces se obtiene la bacteria que es altamente resistente contra cada droga.

25 El grado de resistencia de la bacteria láctica de la cepa BIO- 4R contra las múltiples drogas arriba mencionadas se muestra a continuación basadas en el grado de su cepa madre, (BIO):

30	SM. . . . .	más que 2000 veces
	CM. . . . .	1000 veces
	TC. . . . .	100 veces

-8- 388020



1	EM . . . . .	500 veces
	KM . . . . .	33 "
	F . . . . .	100 "
	ABPC. . . . .	30 "
5	Oleandomicina . . . . .	15 "
	Lincomicina. . . . .	10 "
	Leucomicina . . . . . mas que	60 "
	Penicilina GK . . . . .	20 "
	Cefaloridina. . . . .	20 "
10	Gentamicina . . . . .	40 "
	Spiramicina . . . . .	250 "
	Bicilina V-2 . . . . .	32 "
	Sincilina . . . . .	32 "
	Oracilina . . . . .	160 "
15	Stafoicilina . . . . . mas que	5 "
	Stafoicilina V . . . . . mas que	32 "
	Metocilina S . . . . . mas que	5 "
	Stafoicilina A . . . . . mas que	5 "
	Natacilina. . . . .	320 "

20 También muestra el grado de más de 200 veces de la cepa del Staphylococcus 209 P, ante S.A.,

El medio de droga de placa de agar gradual (medio CA-IA) que es empleado en el presente invento para proveer resistencia a la bacteria láctica de la cepa BIO, contra varias clases de drogas, es preparado como sigue:

25	Extracto de carne. . . . .	10 g.
	Peptona. . . . .	10 g.
	Sal (Cl Na). . . . .	2 g.
	Lactosa. . . . .	20 g.
30	Extracto de levadura . . . . .	20 ml.

388020



- 1 Carbonato cálcido precipitado . . . . . 10 g.
- Agar. . . . . 14 g.

La mezcla de los citados componentes se disuelven en 1000 ml de agua destilada; 10ml. de dicho líquido es esterilizado y vertido en un Petri-Schale esterilizado después de regular el PH; el líquido vertido es solidificado en un gradiente aproximado de 10° y puesto horizontalmente después de ser solidificado y 10 ml. del mencionado líquido, junto con la bebida concentración de dicha droga es vertido sobre dicho medio solidificado para solidificarse laminarmente.

En medio de placa de agar gradual así preparado puede ser usado ventajosamente como medio de cultivo para proveer resistencia contra varios tipos de antibióticos. La cepa BIO- 4R de la bacteria láctica que ha sido provista con resistencia en tal medio mediante el anterior método por el orden de SM, CM, TC, EM, ABPC, es entonces inoculada a una pequeña cantidad de leche en botella el total de lo cual es 10 + 15, y es cultivado por un largo tiempo a la temperatura de 37° C.

El cultivo de leche solidificante es entonces seleccionado en estos cultivos y es otra vez inoculado en un nuevo medio de leche para cultivarlo. En sucesivas transferencias de este cultivo por más de 10 veces es seleccionada la cepa que tenga gran capacidad de crecimiento en medio láctico. Por medio de tales sucesivas transferencias de cultivo, la cepa que ha mostrado solamente un 50 + 60% de índice de crecimiento en el primer cultivo de leche, muestra finalmente 100% y el periodo de solidificación de leche viene a ser también regularmente de 2 + 3 días . La cepa BIO- 4 R de la bacteria láctica obtenida de esta manera fácilmente crece en medio láctico



1 tico cuando cultivada en el medio cuyo principal ingrediente  
es leche desnatada deshidratada y por lo tanto puede ser facil-  
mente pulverizado por spray deshidratante.

5 La técnica para spray deshidratante en culti-  
vo de bacteria-láctica para preparar una droga bacterio-lácti-  
ca estable y pulverulenta es descrito en la patente japonesa  
nº 502.315.

10 Se pulveriza por el spray deshidratador el  
cultivo que ha sido preparado cultivando la mencionada cepa de  
bacteria láctica, con múltiple resistencia a la droga, en el  
medio conteniendo a la concentración de leche desnatada..

Normalmente se añade un excipiente al polvo  
así obtenido para formar una droga bacterio-láctica.

15 Hemos llevado a cabo el siguiente examen pa-  
ra confirmar la múltiple resistencia y el efecto de la droga  
bacterio-láctica obtenida de acuerdo con este invento.

20 Cuando esta droga junto con SM, fué sumini-  
strada oralmente cada día a un ratón no pudo observarse en el  
estiercol un aumento anormal de bacterias del tipo de levadu-  
ra; en cambio, cuando solamente fué suministrado SM a un ratón  
se incrementó marcadamente en el estiercol la presencia de  
bacterias de tipo fermento.

25 Cuando un ratón al que se había suministra-  
do oralmente SM y EM fué atacado por la cepa Nº 11 de la sal-  
monella enteritidis, la mortandad de ellos subió al 80 + 100%  
sin embargo cuando la droga bacterio-láctica compuesta por BIO  
-4R de acuerdo con el presente invento, fué suministrada al  
mismo tiempo o antes que la administración de SM y EM, la mor-  
tandad bajo un 50%

30

Es decir, puede reconocerse que la droga



1 bacterio-láctica, de acuerdo con el presente invento tiene  
resistencia ante el SM, y EM y al mismo tiempo controla el a  
normal incremento de fermento (fenómeno de superinfección) y  
posee una acción de depresión contra las infecciones de salmo  
5 nelle enteritidis.

Lo siguiente es la realización de este inven  
to; sin embargo hay que entender que el propósito del siguien  
te ejemplo es explicar en que consiste el invento y no limi  
tar su alcance.

10 Ejemplo: Una Bio-cepa : del Streptococcus  
faecalis, fué inoculada a un medio de placa de agar gradual  
preparado como ya se ha descrito y al que se le ha añadido SM;  
dicha cepa fué cultivada por el "método de las vetas" durante  
72 horas, a la temperatura de 37° C, por medio del "método de  
15 fabricación de droga en placa de agar gradual"; después del  
cultivo, la colonia que ha crecido en la porción donde la con  
centración de SM es la más alta, es seleccionada entre las co  
lonias crecidas en el plato, y dicha colonia es sometida repeti  
damente a un cultivo de transferencia usando el mismo tipo de  
20 medio. Después que dicho cultivo sucesivo de transferencia ha  
sido aplicado 16 veces, se obtiene la bacteria láctica con al  
ta resistencia contra S.M.

En segundo lugar, esta bacteria láctica con  
resistencia a SM, fué sometida a un cultivo sucesivo de trans  
25 ferencia por 30 veces sucesivamente de la misma manera como he  
mos hecho antes usando el medio adicionado con CM; entonces se  
obtiene la bacteria láctica con resistencia ante la SM, CM.

En tercer lugar, esta bacteria láctica te  
niendo resistencia a SM, CM, fué sometida durante 40 veces con  
30 secutivas a un cultivo de transferencia y usando ahora un medio  
añadido de TC , obteniendose una bacteria láctica con resisten

388020



1      cia a SM, CM, y TC.

5                   En cuarto lugar, esta bacteria láctica que  
tiene resistencia a SM, CM y TC, se somete por 16 veces a un  
cultivo sucesivo de transferencia con un medio de EM y se ob-  
tiene una bacteria láctica resistente ante el SM, CM, TC y EM.  
Finalmente esta bacteria láctica teniendo resistencia a SM,  
CM, TC y EM, se somete ahora a un medio de ABPC, del que se  
obtiene la bacteria láctica (BIO-4R) con resistencia no sola-  
mente contra SM, CM, TC, EM y ABPC sino también contra las va-  
riedades de antibióticos mencionados anteriormente y contra  
10      las sulfa-drogas.

15                   Se ha confirmado que el grado de resistencia  
a las ya mencionadas drogas se alcanza por la aplicación de  
cultivos sucesivos de transferencia con 16 + 17 veces en el  
caso SM; 30 + 40 veces en el caso CM; 40 + 50 veces en el  
caso de TC; 16 + 17 veces en el caso de EM y de 20 + 30 veces  
en el caso de ABPC.

20                   La cepa BIO-4R de la bacteria láctica que  
tiene una resistencia múltiple a la droga, obtenida de acuerdo  
con el método mencionado anteriormente fué inoculada entonces  
al medio láctico (cerca del 15 ml.) el cual ha sido preparado  
mezclando SM 2.000  $\gamma$ /ml ( $\mu$ g), CM 15  $\gamma$ /ml, TC 10  $\gamma$ /ml, EM 100  
 $\gamma$ /ml, y ABPC 20  $\gamma$ /ml; de allí fue seleccionada la cepa con ma-  
yor capacidad de solidificar leche. Dicha cepa seleccionada  
25      fué repetidamente sometida a tal procedimiento por 10+ 15 veces  
para obtener una cepa con capacidad activa de solidificar le-  
che, es decir, gran capacidad de crecimiento en medio de leche,  
Entonces la cepa así obtenida fué cultivada en un medio conte-  
niendo aproximadamente 18% la leche desnatada durante 96 horas,  
30      y después de que la bacteria láctica ha crecido suficientemen-



1 te, el cultivo fué pulverizado por medio de un spray deshidra-  
tante instantáneo a la temperatura de 70 a 100° C. Después de  
la pulverización se puede mezclar un excipiente de varios ti-  
pos de enzimas, vitaminas y especies tal como haga falta para  
5 la preparación pulverizada anterior.

Descrita suficientemente la naturaleza del  
presente invento así como su realización industrial, sólo ca-  
be añadir que en su conjunto y partes constitutivas es posible  
introducir cambios de forma, materia y disposición en cuanto  
tales alteraciones no disvirtuen su fundamento.  
10

El solicitante, al amparo de los Convenios  
Internacionales sobre Propiedad Industrial, se reserva el de-  
recho de extender esta demanda a los países extranjeros, si  
fuera posible, reivindicando la misma prioridad de la presen-  
te solicitud.  
15

NOTA

Igualmente el solicitante se reserva el de-  
recho de introducir en la presente invención cuantos perfeccio-  
namientos se deriven de la misma mediante la solicitud de  
los correspondientes Certificados de Adición en la forma seña-  
lada por la Ley.  
20

La Patente de Invención que se solicita por  
veinte años para España de acuerdo con la vigente Legislación  
sobre Propiedad Industrial, deberá recaer sobre "PROCEDIMIENTO  
25 DE PREPARACION DE UNA DROGA BACTERIO-LACTICA", en todo de a-  
cuuerdo con las siguientes:

REIVINDICACIONES

1ª.- Procedimiento de preparación de una dro-  
ga bacterio-láctica, caracterizado porque comprende fabricar  
30 a partir de una cepa de Streptococcus faecalis resistente a



1 las sulfa-drogas, una bacteria con resistencia contra varias  
clases de antibióticos y sulfa-drogas aplicando el "método de  
2 fabricación de droga en placa de agar gradual", y "técnica de  
transferencia repetida en presencia de concentraciones subin  
5 hibidoras de un antibiótico", en el orden de Streptomycin,  
Cloranfenicol, Tetraciclina, Eritromicina y Aminobencilo-peni  
cilina; a continuación se somete dicha cepa a un cultivo suce  
sivo de transferencia en medio láctico conteniendo las mencio  
nadas cinco clases de drogas para estabilizar su capacidad  
10 de crecimiento en medio láctico y entonces, después del culti  
vo de la cepa en un medio de leche desnatada, se pulveriza el  
cultivo por medio de un pulverizador-deshidratador.

2.ª- Procedimiento de preparación de una  
15 droga bacterio-láctica, de acuerdo con la anterior reivindica  
ción, caracterizado porque los cultivos sucesivos de transfe  
rencia se ejecutan dieciseis a diecisiete veces para proveer  
resistencia contra la Streptomycin.

3.ª- Procedimiento de preparación de una  
20 droga bacterio-láctica, de acuerdo con las anteriores reivin  
dicaciones, caracterizado porque los cultivos sucesivos de  
transferencia son efectuados treinta a cuarenta veces para pro  
veer resistencia contra el Cloranfenicol.

4.ª- Procedimiento de preparación de una  
25 droga bacterio-láctica, de acuerdo con las anteriores reivin  
dicaciones, caracterizado porque los cultivos sucesivos de  
transferencia son efectuados cuarenta a cincuenta veces para  
proveer resistencia contra la Tetraciclina.....

5.ª- Procedimiento de preparación de una  
30 droga bacterio-láctica, de acuerdo con las anteriores reivin  
dicaciones, caracterizado porque los cultivos sucesivos de

388020



1 transferencia son efectuados dieciseis a diecisiete veces pa-  
ra proveer resistencia contra la Eritromicina.

5 6ª.- Procedimiento de preparación de una  
droga bacterio-láctica, de acuerdo con las anteriores reivin-  
dicaciones, caracterizado porque los cultivos sucesivos de  
transferencia son efectuados veinte a treinta veces para pro-  
veer resistencia contra la Aminobencilo-Penicilina.

10 7ª.- Procedimiento de preparación de una  
droga bacterio-láctica, de acuerdo con las anteriores reivin-  
dicaciones, caracterizado porque los cultivos sucesivos de  
transferencia son efectuados diez a quince veces en medio lác-  
tico.

15 8ª.- "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UNA  
DROGA BACTERIO-LACTICA".

Según queda sustancialmente descrito en la  
presente memoria descriptiva que consta de quince hojas meca-  
nografiadas por una sola cara.

Madrid, 6 FEB. 1971

El Agente Oficial  
MIGUEL FERNÁNDEZ-LOAYSA PINZON  
P. P.

*M. Fernández*

20

25

30

*[Handwritten mark]*