

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

19 ES	11 21	NUMERO 452.021	10 A1
	22	FECHA DE PRESENTACION 30-9-76	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
619.107	2-10-75	ESTADOS UNIDOS

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D; A61K	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

54 TITULO DE LA INVENCION

UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE LA MEZCLA ANTIBIOTICA A-30912.

71 SOLICITANTE (S)

ELI LILLY AND COMPANY

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

307 East Mc Cartty Street, INDIANAPOLIS, Indiana 46206, Estados Unidos.

72 INVENTOR (ES)

Marvin Martin HOEHN de nacionalidad estadounidense y Karl Heinz MICHEL de nacionalidad alemana.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU.

CONCEDIDA
18 OCT. 1977

**POOR
QUALITY**

1 Esta invención se refiere a una nueva mezcla
antibiótica A-30912 que comprende por lo menos 7 facto-
res individuales A, B, C, D, E, F y G. La mezcla anti-
biótica A-30912 se produce cultivando una nueva cepa
5 del organismo *Aspergillus rugulosus* NRRL 8113.

El término "mezcla antibiótica" según se uti-
liza en esta memoria se refiere a una mezcla de factores
antibióticos individuales co-producidos. Como se reco-
nocerá por aquellos familiarizados con la producción de
10 antibióticos mediante fermentación, la relación de fac-
tores individuales producidos en una mezcla antibiótica,
variará dependiendo de las condiciones de fermentación
utilizadas.

Los factores antibióticos individuales de la
15 presente invención se designan como factores antibióti-
cos A-30912, A, B, C, D, E, F y G.

Es el objeto de esta invención proporcionar la
nueva mezcla antibiótica A-30912 y los factores antibió-
ticos A-30912 B, C, D, E, F y G.

20 Es también el objeto de esta invención propor-
cionar procedimientos para la producción y separación de
la mezcla antibiótica A-30912 que comprende los factores
A, B, C, D, E, F y G, y el aislamiento de los factores
A, B, C, D, E, F y G.

25 La presente invención proporciona un nuevo
procedimiento para la producción de la mezcla antibióti-
ca A-30912 que comprende los factores A, B, C, D, E, F y
G, caracterizado por:

30 a) el cultivo de *Aspergillus rugulosus* NRRL
8113 en un medio de cultivo que contiene fuentes asim-

1 lables de carbohidrato, de nitrógeno y de sales inorgá-
nicas, en condiciones de fermentación aeróbica sumergi-
da, hasta que se produce una cantidad sustancial de ac-
tividad antibiótica; y

5 b) opcionalmente, la separación de la mezcla
antibiótica A-30912 del medio de cultivo; y

c) opcionalmente, el aislamiento de los facto-
res antibióticos A-30912 A, B, C, D, E, F o G de la mez-
cla antibiótica A-30912.

10 La mezcla antibiótica A-30912 se extrae del me-
dio de fermentación con disolventes orgánicos polares.

15 El compuesto conocido de esterigmatocistina se
produce también mediante *Aspergillus rugulosus* NRRL 8113.
La esterigmatocistina se extrae ya sea separadamente con
un disolvente orgánico no polar o junto con la mezcla
antibiótica A-30912 con disolventes orgánicos polares.
En el último caso, la mezcla antibiótica A-30912 se se-
para del esterigmatocistina mediante concentración del
disolvente de extracción, agregando el concentrado a un
20 exceso de un disolvente orgánico no polar, tal como éter
dietílico, y separando la mezcla antibiótica A-30912 co-
mo precipitado. La esterigmatocistina se separa en el
filtrado. La mezcla antibiótica A-30912 se purifica adi-
cionalmente mediante cromatografía en columna.

25 La mezcla antibiótica A-30912 y los factores
individuales A-30912 son agentes antifúngicos.

Los espectros de absorción infrarroja de los
siguientes factores A-30912 en pastilla de KBr se pre-
sentan en los dibujos anexos:

30 Figura 1 - antibiótico A-30912 factor A

Figura 2 - antibiótico A-30912 factor D

Figura 3 - antibiótico A-30912 factor B

Figura 4 - antibiótico A-30912 factor C

Antibiótico A-30912 factor A

El A-30912 factor A es también similar al antibiótico de polipéptido Echinocandin B recientemente reportado por F. Benz y otros, Helv. Chim. Acta 57, 2459-2477 (1974).

El antibiótico A-30912 factor A es un sólido amorfo blanco. El análisis elemental de A-30912 A dió la siguiente composición en porcentaje:

Carbón, 56,52%; hidrógeno, 7,29%; nitrógeno, 8,68%; oxígeno, 27,09%.

La fórmula empírica aproximada propuesta para el antibiótico A-30912 factor A es $C_{51-53}H_{79-83}N_7O_{17-19}$. Dentro de esta escala aproximada, el análisis elemental del A-30912 factor A corresponde especialmente bien con la fórmula empírica de $C_{52}H_{81}N_7O_{18} \cdot H_2O$ (Calc.: C, 56,24; H, 7,54; N, 8,84; O, 27,39).

El antibiótico A-30912 factor A tiene un peso molecular aproximado de 1100, según se determina mediante espectrometría de masas y titulación.

El espectro de absorción infrarroja del antibiótico A-30912 factor A en pastilla de KBr se muestra en la figura 1 de los dibujos anexos. Se observan los siguientes máximos de absorción característicos: 2,97 (fuerte), 3,39 (medio), 3,47 (débil), 5,99 (fuerte), 6,10 (fuerte), 6,49 (medio), 6,56 (medio), 6,90 (medio), 8,00 (débil), 9,13 (débil), y 11,77 (débil), micras.

Los espectros de absorción ultravioleta del

1 antibiótico A-30912 factor A en metanol tanto neutro
como ácido exhiben máximos de absorción a 225 nm (épsi-
lon 18,000), 275 nm (épsilon 3,000) y 284 nm (resalto
épsilon 2,500). El espectro ultravioleta del factor A
5 en metanol básico, muestra máximos de absorción a 245 nm
(épsilon 16,000) y 290 nm (épsilon 3,000) y también una
absorción final.

El espectro de resonancia magnética nuclear
1 ^{13}C del antibiótico A-30912 factor A en perdeuterometan-
ol, muestra las siguientes características:
10 delta 176,1, 174,3, 173,4, 172,7, 172,4, 169,8, 158,4,
132,8, 130,9, 129,6, 129,0, 116,2, 77,0, 75,7, 74,4,
71,3, 70,9, 69,6, 68,3, 62,4, 58,7, 56,9, 56,1, 52,9,
39,0, 38,5, 36,8, 35,2, 33,9, 32,9, 32,6, 30,7, 30,4,
15 30,2, 28,2, 27,0, 26,5, 23,6, 20,1, 19,6, 14,4, y 11,3 ppm

El antibiótico A-30912 factor A tiene las si-
guientes rotaciones específicas:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{25} -44^{\circ} \text{ (c 0,5, CH}_3\text{OH)}$$

20
$$[\alpha]_{365}^{25} - 156^{\circ} \text{ (c 0,5, CH}_3\text{OH)}$$

La titulación electrométrica del antibiótico
A-30912 factor A en dimetilformamida acuosa al 66% in-
dicó la presencia de un grupo titulable con un valor de
pK_a de 12,8 (pH inicial 6,9).

25 El análisis de aminoácido del antibiótico
A-30912 factor A indicó la presencia, después de hidró-
lisis, de treonina, hidroxiprolina y otros tres amino-
ácidos aún no identificados.

30 El antibiótico A-30912 factor A es soluble
en una variedad de disolventes orgánicos tales como

1 metanol, etanol, dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo,
y acetato de etilo; pero es insoluble en disolventes or-
gánicos no polares tales como éter dietílico y éter de
petróleo. El antibiótico A-30912 factor A es también so-
5 luble en soluciones acuosas, especialmente aquellas que
tienen un pH mayor que 7,0.

A-30912 Factor D

10 El antibiótico A-30912 factor D es un sólido
amorfo blanco. El análisis elemental de A-30912 factor
D dió la siguiente composición en porcentaje: carbono,
56,37 por ciento; hidrógeno, 8,17 por ciento; nitrógeno,
8,54 por ciento; oxígeno (por diferencia), 26,92 por
ciento.

15 El antibiótico A-30912 factor D tiene un peso
molecular aproximado de 1100, con base en el análisis de
aminoácido y su relación estructural íntima con respecto
al antibiótico A-30912 factor A.

20 El espectro de absorción infrarroja del anti-
biótico A-30912 factor D en pastilla de KBr se muestra
en la figura 2 de los dibujos anexos. Se observan los
siguientes máximos de absorción característicos: 2,98
(fuerte), 3,31 (débil), 3,3 (resalto), 3,40 (medio),
3,48 (débil), 5,76 (débil), 6,01 (fuerte), 6,10 (resal-
to), 6,49 (medio), 6,57 (medio), 6,90 (medio), 7,81 (dé-
25 bil), 8,07 (débil) y 9,16 (débil), micras.

30 Los espectros de absorción ultravioleta (UV)
del antibiótico A-30912 factor D en metanol neutro y
ácido, exhiben máximos de absorción a 225 nm (épsilon
18,000), y 275 nm (épsilon 2,500). El espectro ultra-
violeta de A-30912 factor D en metanol básico exhibe

1 máximos de absorción a 240 nm (épsilon 11,000) y 290 nm
(épsilon 3,000).

5 El antibiótico A-30912 factor D tiene la si-
guiente rotación específica: $[\alpha]_D^{25} -50^{\circ}$ (c 0.34,
CH₂OH).

10 El análisis de aminoácido del antibiótico
A-30912 factor D, después de hidrólisis, indicó la pre-
sencia de treonina, hidroxiprolina, histidina y otros
tres aminoácidos aún no identificados. Uno de los ami-
noácidos del antibiótico A-30912 factor D no identifi-
cado, es idéntico a aquel de los aminoácidos del anti-
biótico A-30912 factor A no identificados.

15 El antibiótico A-30912 factor D es soluble en
una variedad de disolventes orgánicos tales como metanol,
etanol, dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo y aceta-
to de etilo; pero es insoluble en disolventes orgánicos
no polares tales como éter dietílico y éter de petróleo.
El antibiótico A-30912 factor D es soluble en soluciones
acuosas, especialmente aquellas que tienen un pH mayor
20 que 7,0.

A-30912 Factor B

25 El antibiótico A-30912 factor B es un sólido
amorfo blanco. El análisis elemental de A-30912 factor
B dió la siguiente composición aproximada en porcentaje:
carbono, 57,36 por ciento; hidrógeno, 5,92 por ciento;
nitrógeno, 8,75 por ciento; oxígeno 26,19 por ciento.

30 El espectro de absorción infrarroja de A-30912
factor B en pastilla de KBr se muestra en la figura 3 de
los dibujos anexos. Se observan los siguientes máximos
de absorción característicos: 2,99, 3,41, 3,49, 6,06,

1 6,15, 6,54, 6,61, 6,94, 7,62, 8,07, 9,26 y 9,39 micras.

Los espectros de absorción ultravioleta de A-30912 factor B en metanol tanto neutro como ácido exhiben máximos de absorción a 223 nm (resalto, épsilon 16,000), y 278 nm (épsilon 2,400). El espectro ultravioleta del antibiótico A-30912 factor B en metanol básico, muestra máximos de absorción a 242 nm (épsilon 13,900) y 292 nm (épsilon 2,800).

10 El A-30912 factor B tiene las siguientes rotaciones específicas aproximadas: $[\alpha]_D^{25} -47^\circ$ (c 0,5, CH₃OH).

$[\alpha]_{365}^{25} -170^\circ$ (c, 0,5, CH₃OH).

15 La titulación electrométrica de A-30912 factor B en dimetilformamida acuosa al 66% indicó la presencia de un grupo tituable con un valor de pK_a de 13,0 (pH inicial 7,91).

20 El análisis de aminoácido de A-30912 factor B indicó la presencia, después de hidrólisis ácida normal de treonina, hidroxiprolina y varios amino ácidos aún no identificados.

25 El A-30912 factor B es soluble en una variedad de disolventes orgánicos tales como metanol, etanol, dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo y acetato de etilo, pero es insoluble en disolventes orgánicos no polares tales como éter dietílico y éter de petróleo. El A-30912 factor B es también insoluble en soluciones acuosas, especialmente aquellas que tienen un pH mayor que 7,0.

A-30912 Factor C

30 El antibiótico A-30912 factor C es un sólido

1 amorfo blanco. El análisis elemental de A-30912 factor C dió la siguiente composición aproximada en porcentaje: carbono, 56,76 por ciento; hidrógeno, 7,88 por ciento; nitrógeno, 10,61 por ciento; oxígeno, 25,09 por ciento.

5 El espectro de absorción infrarroja de A-30912 factor C en pastilla de KBr se muestra en la figura 4 de los dibujos anexos. Se observan los siguientes máximos de absorción característicos: 2,98, 3,39, 3,43, 3,51, 6,01, 6,12, 6,47, 6,90, 7,04, 7,22, 7,38, 8,00, 8,30 y 9,13 micras.

10 Los espectros de absorción ultravioleta de A-30912 factor C en metanol tanto neutro como ácidos exhiben máximos de absorción a 223 nm (resalto, ϵ 7,300) y 275 nm (ϵ 1,350). El espectro ultravioleta del antibiótico A-30912 factor C en metanol básico, muestra máximos de absorción a 240 nm (ϵ 12,400) y 290 nm (ϵ 5,200).

15 El A-30912 factor C tiene las siguientes rotaciones específicas aproximadas:

20
$$[\alpha]_D^{25} -33^\circ \text{ (c, 0.5, CH}_3\text{OH)}$$
$$[\alpha]_{365}^{25} -119^\circ \text{ (c, 0.5, CH}_3\text{OH)}.$$

25 La titulación electrométrica de A-30912 factor C en dimetilformamida acuosa al 66% indicó la presencia de un grupo titulable con un valor de pK_a de aproximadamente 13,08 (pH inicial de 7,93).

El análisis de aminoácido de A-30912 factor C indicó la presencia, después de hidrólisis ácida normal, de treonina, hidroxiprolina y varios aminoácidos aún no identificados.

30 El A-30912 factor C es soluble en una variedad

1 de disolventes orgánicos tales como metanol, etanol,
dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo y acetato de
etilo; pero es insoluble en disolventes orgánicos no po-
5 lares tales como éter dietílico y éter de petróleo. El
A-30912 factor C es también soluble en soluciones acu-
sas, especialmente aquellas que tienen un pH mayor que
7,0.

10 Los siete factores individuales de la mezcla
antibiótica A-30912 pueden separarse e identificarse me-
diante el empleo de la cromatografía en capa fina (CCD).
El gel de sílice es un adsorbente preferido; y el ben-
ceno:metanol (7:3, V:V) es un sistema disolvente pre-
ferido.

15 Los valores de R_f del antibiótico A-30912
factores A-G, utilizando gel de sílice (Merck, Darm-
stadt) CCD, el sistema disolvente de benceno:metanol
(7:3) y la bioautografía con *Candida albicans*, se dan
en el cuadro I.

CUADRO I

20

<u>Antibiótico A-30912 Factor</u>	<u>Valor de R_f</u>
A	0,35
B	0,45
C	0,54
25 D	0,59
E	0,27
F	0,18
G	0,13

30 Se dan en el cuadro II los valores de R_f del
antibiótico A-30912 factor A en diversos sistemas cro-

1 matográficos en papel, utilizando nuevamente *Candida albicans* como organismo de detección.

CUADRO II

A-30912 Factor A Valor de R _f	Sistema disolvente
0,76	Butanol saturado con agua
0,69	Butanol saturado con agua más ácido p-toluensulfónico al 2%
0,75	Metanol:HCl 0,1 normal (3:1)
10 0,17	Butanol:etanol:agua (13,5:15:150)
0,78	Metanol:citrato de sodio 0,05 mo- lar a un pH de 5,7 (7:3); papel tamponado con citrato de sodio 0,05 molar a un pH de 5,7.

15 El organismo útil para la preparación de la
mezcla antibiótica A-30912 se aisló de una muestra de
tierra de las ruinas de Pompeya, Italia. El organismo
producto de A-30912 se clasifica como una cepa de *As-
pergillus rugulosus* Thom y Raper, la cual está en el
20 grupo de la forma *Aspergillus nidulans*. Esta clasifica-
ción se basa en la descripción de K.B. Raper y D.I. Fennel
en "El Género *Aspergillus*", The Williams and Wilkins
Company, Baltimore, Md., 1965.

25 Los nombres de color fueron asignados de con-
formidad con el "método ISCC-NBS (K.L. Kelly y D. B.
Judd, "The ISCC-NBS Method of Designating Color an a
Dictionary of Color Names", Departamento de Comercio de
los Estados Unidos, Circ. 553, Washington, D.C., 1955).
Los bloques de color de Maerz y Paul se describen por
30 A. Maerz y M. R. Paul en "Dictionary of Color", McGraw-

1 Hill Book Company, Nueva York, N.Y., 1950.

Los cultivos se desarrollaron a 25°C., a menos que se especifique de otra manera.

5 Características del Cultivo de A. rugulosus
NRRL 8113 Agar de Solución de Czapek.

10 El cultivo se desarrolla lentamente, obteniéndose de 1,5 a 2,0 cm. de diámetro en 15 días a 25°C. La superficie de la colonia es convexa y vellosa, arrugándose con el añejamiento cerca del centro y después formando joroba. La periferia del micelio es una banda de 2 mm. de ancho de hifas incoloras profundamente sumergidas y es sinuoso. Se forma un exudado café rosáceo en las hifas aéreas marginales. En, de 7 a 14 días, se produce un pigmento soluble púrpura pálido en el agar que rodea a la colonia. El pigmento se difunde a través de la colonia en 15 días.

15 Después de 5 días, la superficie de la colonia varía de blanco a color ante, y el reverso de la colonia es anaranjado pardusco en el centro y de pardusco a púrpura pardusco en las regiones periféricas. En 10 días la colonia es de un color rosa-amarillento moderado (ISCC-NBS 29 y Maerz y Paul 11-A-7). Después de 14 días, la colonia es de color rojo grisáceo claro (ISCC-NBS 18 y Maerz y Paul 4-G-7). El área marginal se hace verrugosa y es de color amarillo intenso (ISCC-NBS 84 y Maerz y Paul 10-L-5) debido a la formación de conidios. Se presentan aglomeraciones amarillentas sin punta, diseminadas de células de envoltura, aleatoriamente sobre la superficie y a lo largo del margen de la colonia. Con el añejamiento, los parches de color

20

25

30

1 amarillo intenso y el área marginal se hace verde amari-
 llenta. Después de 3 semanas; se observa un tono púr-
 pura anaranjado en los nuevos componentes aéreos del
 margen. Inicialmente, el reservo de la colonia es lige-
5 ramente cóncavo. A medida que madura, la colonia se
 aplana a la superficie de agar y el reverso se arruga
 ligeramente. En 10 días el reverso se hace de color ca-
 fé claro (ISCC-NBS 57 y Maerz y Paul 5-A-10). En 15
 días es de color rojo grisáceo (ISCC-NBS 19 y Maerz y
10 Paul 6-J-3).

 El estado conidiógeno está esparcido; y los
 conidióforos se diseminan sobre la superficie, presen-
 tándose a veces como parches o en una banda submargi-
 nal. Las cabezas de los conidios son al principio flo-
15 jamente radiadas y redondeadas; con el añejamiento, pue-
 den desarrollarse como formas columnares cortas que son
 más compactas. Las cabezas redondeadas son de 70 mi-
 cras a 80 micras de diámetro y promedian 50 micras. Las
 cabezas columnares pueden ser hasta de 140 micras de
20 longitud y de 70 micras de ancho.

 Los conidios son de redondeados a subredon-
 deados, rugosos y de un color dorado verdoso en masse.
 Varían de 2,8 micras a 3,9 micras de diámetro y prome-
 dian 3,2 micras.

25 Los esterigmatos son biseriados e incolores.
 Los esterigmatos primarios varían en longitud de 4,7 mi-
 cras a 11,0 micras y promedian 7,9 micras. En su punto
 más ancho, son de 2,4 micras y se ahusan a 1,6 micras.
 Los esterigmatos secundarios pueden presentarse indi-
30 vidualmente o en pares, surgiendo de los primarios, y

1 son de la forma del matraz. En su punto más ancho mi-
den 3,0 micras y se ahusan apicalmente a 0,4 micras en
donde se hacen tubulares. El vértice tubular es de una
longitud de 1,2 micras. La longitud global varía de
5 5,5 micras a 12,6 micras y promedia 9,2 micras.

Los vesículos son de redondeados a sub-redon-
deados o hemiesféricos y pueden aplastarse apicalmente,
haciéndose parduscos con el añejamiento. Varían de
7,4 micras a 11,2 micras de diámetro y promedia 9,4 mi-
10 cras.

Los conidióforos son uniformes, de pared rela-
tivamente delgada y son al principio hialinos, desarro-
llándose después a un color café canela claro. Son li-
geramente más anchos en la vesícula y pueden ahusarse
15 ligeramente cerca de la célula de pie. La anchura pro-
medio es de 5,9 micras. Los conidióforos varían de
47,7 micras a 166,6 micras y promedian 106 micras de
longitud. Surgen de las hifas sumergidas o lateralmen-
te de los filamentos hifales, aéreos.

20 El estado ascógeno aparece hasta en 20 días.
Las aglomeraciones amarillentas pequeñas de las células
de envoltura que se presentan en la superficie pueden
encontrarse en cualquier nivel en el micelio. Consis-
ten en células de envoltura que desarrollan una o más
25 cleistotecias. Las células de envoltura son de redondea-
das a sub-redondeadas o de ovaladas a alargadas, son de
pared delgada y son hialinas. Las células de envoltura
redondeadas varían de 18 micras a 24 micras de diámetro
y promedian 21,8 micras.

30 Las cleistotecias son de redondeadas a sub-

1 redondeadas, de pared delgada, relativamente duras y fi-
brozas. Al principio son relativamente incoloras, y se
hacen púrpura rojizas y se oscurecen con el añejamiento.
Miden de 165 micras a 470 micras de diámetro y promedian
5 275 micras.

Agar de Extracto de Malta

Las colonias desarrolladas a 25°C, se expanden
rápidamente, obteniendo de 4-5 cm. en 10-12 días. Al
principio las colonias de color blanco grisáceo se hacen
10 de color verde oliva moderado (ISCC-NBS 90 y Maerz y
Paul 23-E-6) en 4 días. La periferia, de sinuosa a dé-
bilmente lobulada consiste en inhifas aéreas blandas,
cortas, apretadamente empacadas. Las aglomeraciones ama-
rillentas pequeñas de las células de envoltura puntean
15 el margen y se dispersan aleatoriamente sobre la super-
ficie de agar similar a un fieltro. Después de 20 días,
estas aglomeraciones de célula de envoltura tienden a
encostrar mucha superficie. El reverso de la colonia
es de color amarillo grisáceo (ISCC-NBS 90 y Maerz y
20 Paul 11-B-1).

El estado ascógeno aparece en 15 días. Las
aglomeraciones amarillentas pequeñas de células de en-
voltura que se presentan sobre la superficie, pueden en-
contrarse en cualquier nivel en el micelio. Consisten
25 de células de envoltura que envuelven una o más cleis-
totecias. Las células de envoltura pueden encostrar
grandes áreas sobre las cabezas de los conidios. Las
células de envoltura son de redondeadas a sub-redondea-
das, o de ovaladas a alargadas, son de pared delgada
30 y son hialinas. Las células de envoltura redondeadas

1 varían de 18 micras a 24 micras de diámetro y promedian 21,8 micras.

5 Las cleistotecias son de redondeadas a sub-redondeadas y son de color café rojizo oscuro. Varían de 389 micras a 700 micras de diámetro y promedian 506 micras.

10 Las ascas son frágiles, hialinas y de sub-redondeadas a ovaladas. Las ascas sub-redondeadas son de 8,7 micras a 11,9 micras de diámetro y promedian 10,3 micras. Las ascas ovaladas son de 10,3 micras a 14,2 micras x 8,7 micras a 10,3 micras, y promedian 12,2 micras x 9,1 micras.

15 Las ascósporas son de color rojo-anaranjado, rugosas, con dos crestas ecuatoriales delicadamente plegadas, paralelas, que son de hasta 0,8 micras de ancho y continuas. La ascóspora aparece lenticular a través del eje longitudinal. Cuando la cresta es periférica, la ascóspora es redondeada. En la vista redondeada ésta es de 4,9 micras a 6,3 micras y promedian 5,4 micras.

20 Dos características de la cepa productora del antibiótico A-30912 de *Aspergillus rugulosus* difieren de las características de *A. rugulosus* descrita por Ra-
per y Fennel, anteriormente. La cepa productora de A-30912 tiene ascósporas y cabezas de conidios más grandes.

25 El cultivo de *Aspergillus rugulosus* para la producción de la mezcla antibiótica A-30912 se ha depositado y forma parte de la colección de cultivos de depósito del Northern Regional Research Laboratory, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Servicio
30

1 de Investigación Agrícola, Peoria, Illinois 61604, de
la cual es disponible al público bajo el número NRRL
8112.

5 Puede emplearse cualquiera de un número de me-
dios de cultivo para desarrollar *Aspergillus rugulosus*
NRRL 8113. Para economía en la producción, rendimiento
óptimo y facilidad de aislamiento de producto, sin em-
bargo, se prefieren ciertos medios de cultivo. De esta
10 manera, por ejemplo, una fuente de carbohidrato preferi-
da en la fermentación en gran escala es la glucosa, aun-
que pueden emplearse melasas, almidón, lactosa, sacarosa,
maltosa, glicerol y similares. Las fuentes de nitrógeno
preferido son caseína hidrolizada con enzima y peptona
de carne soluble, aunque pueden también utilizarse gra-
15 nos de la recuperación de desperdicios de la fabricación
de alcohol, glutamato monosódico y similares. Las sales
inorgánicas nutritivas pueden incorporarse en los medios
de cultivo. Estas incluyen las sales solubles usuales
capaces de producir sodio, magnesio, calcio, amonio,
20 cloruro, carbonato, sulfato, nitrato e iones similares.

Deben también incluirse en el medio de culti-
vo, elementos en trazas esenciales necesarios para el
desarrollo y crecimiento del organismo. Dichos elemen-
tos en traza se presentan comúnmente como impurezas o
25 como otros constituyentes del medio en cantidades sufi-
cientes para cumplir con los requerimientos de desarro-
llo del organismo.

Puede ser necesario agregar pequeñas cantida-
des (esto es, 0,2 ml./l.) de un agente antiespumante
30 tal como polipropilenglicol a los medios de fermentación

1 en gran escala, si la espumación se convierte en un problema.

5 Para la producción de una cantidad sustancial de la mezcla antibiótica A-30912, se prefiere la fermentación aeróbica sumergida en tanques. Pueden obtenerse pequeñas cantidades de la mezcla antibiótica A-30912 mediante el cultivo en matraz agitado. Debido al retraso en el tiempo en la producción de antibiótico, comúnmente asociado con la inoculación de tanques grandes con la forma de spora del organismo es preferible emplear un inóculo vegetativo. El inóculo vegetativo se prepara inocular un pequeño volumen de medio de cultivo con la forma de spora o los fragmentos miceliales del organismo para obtener un cultivo del organismo nuevo, que se desarrolla en forma activa. El inóculo vegetativo se transfiere entonces a un tanque más grande. El medio utilizado para el desarrollo del inóculo vegetativo puede ser el mismo que aquel utilizado para fermentaciones mayores, pero pueden emplearse también otros medios. El organismo que produce el antibiótico A-30912 puede desarrollarse a temperaturas de entre aproximadamente 20° y 43°C.; el organismo se desarrolla bien a temperaturas de aproximadamente 25°-30°C. La producción óptima de la mezcla antibiótica A-30912, parece que ocurre a una temperatura de aproximadamente 25°C.

25 Como es usual en los procedimientos de cultivo sumergido aeróbico, se burbujea aire estéril a través del medio de cultivo. Para una producción de antibiótico eficiente, el volumen de aire empleado en la producción de tanque es preferiblemente superior a 0,4 volúmenes de

30

1 aire por volúmen de medio de cultivo por minuto (V/V/M).

5 La producción de la mezcla antibiótica A-30912
puede seguirse durante la fermentación mediante el pro-
bado de muestras de extractos alcohólicos del caldo en-
tero de actividad antibiótica contra un organismo que
se conoce es sensible a los antibióticos A-30912. Un
organismo de análisis útil en el probado en cuanto a
la presencia de la mezcla antibiótica A-30912 es *Candi-*
da albicans. El bioanálisis se lleva a cabo convenien-
10 temente mediante análisis de papel-disco sobre placas de
agar sembradas.

15 En términos generales, la actividad antibióti-
ca puede detectarse en el segundo día de fermentación.
La producción máxima de la actividad antibiótica se pre-
senta usualmente entre aproximadamente el tercero y el
sexto días.

20 Los factores antibióticos A-30912 son agentes
antifúngicos. Son ilustrativas de la actividad antifun-
gíca de los factores de antibiótico A-30912 las pruebas
in vitro con el antibiótico A-30912 factores A y D. Es-
tas pruebas se resumen en el cuadro III. La actividad
antifúngica se midió mediante el método de difusión en
disco convencional (se sumergieron almohadillas de 6 mm.
25 en soluciones que contienen el compuesto de prueba; se
colocaron almohadillas sobre placas de agar sembradas
con el organismo de prueba). Los resultados se dan co-
mo la concentración inhibitoria mínima (CIM) por disco,
en la cual el compuesto de prueba inhibió el organismo
de prueba.

30

1

CUADRO III

Organismo de Prueba	CIM (mcg/disco)	
	Antibiótico A-30912 Factor A	Antibiótico A-30912 Factor D
5 Candida albicans	0,625	0,5
Trichophyton mentagrophytes	0,078	0,07

El A-30912 factor A es muy activo en las pruebas de difusión en disco in vitro contra dermatofitos. Los resultados de esta prueba se resumen en el cuadro IV.

10

CUADRO IV

A-30912 FACTOR A CONTRA DERMATOFITOS

Dermatofito	No.de aislados	CIM (mcg./disco)
Trichophyton mentagrophytes	13	1,25 - 0,039
Trichophyton gallinae	1	> 1,25
15 Trichophyton meginini	1	0,0195
Trichophyton quinckeanum	1	> 1,25
Trichophyton rubrum	1	< 0,0098
Trichophyton schoenleinii	1	0,0195
Trichophyton terrestre	1	0,0195
20 Trichophyton tonsurans	9	> 1,25 - 0,156
Microsporium Gypseum	5	0,156-0,038
Microsporium audouinii	4	1,25-0,156
Microsporium canis	6	1,25-0,0098
Microsporium cookei	2	1,25-0,0195
25 Nannizzia incurvata	1	0,312
Phalaphere Jean salemi	1	> 1,25
Epidermatophyton floccosum	1	1,25
Geotrichum candidum	4	> 1,25-0,156
30 Keratinomyces ajellio	1	0,156

1 La actividad antifúngica de los factores anti-
bióticos A-30912 se demostró adicionalmente mediante
pruebas in vivo. Las pruebas in vivo se llevaron a cabo
en la siguiente forma: Se proporcionan tres dosis del
5 compuesto de prueba a ratones infectados con *Candida albicans*, 0, 4 y 24 horas después de la infección. La
protección que proporciona el compuesto de prueba se mide
como un valor de DE₅₀ [la dosis efectiva en mg/kg.
que protege 50 por ciento de los ratones; ver W. Wich y
10 otros, J. Bacteriol. 81, 233-235 (1961)]. Los valores
de DE₅₀ para el antibiótico A-30912 factor A contra *Candida albicans* en ratones, fueron de 30 mg/kg. (administración intraperitoneal) y 50 mg/kg. (administración subcutánea). El valor de DE₅₀ para el antibiótico A-30912
15 factor D contra *Candida albicans* en los ratones fué de
33 mg/kg. (administración subcutánea).

No existieron señales de toxicidad aguda cuando el antibiótico A-30912 factor A, se administró intraperitonealmente (ip) o subcutáneamente (SG) a ratones
20 a 100 mg/kg. dos veces por día durante tres días (un total de 600 mg/kg). Tampoco existieron señales de toxicidad aguda cuando el antibiótico A-30912 factor A se administró intraperitonealmente a ratones a 200 mg/kg. tres veces al día (una dosis total de 600 mg/kg.).

25 No existieron señales de toxicidad aguda cuando el antibiótico A-30912 factor D se administró subcutáneamente a ratones tres veces al día a 14 mg/kg. (una dosis total de 42 mg/kg.).

30 Cuando se utilizan como agentes antifúngicos, los factores antibióticos A-30912 se administran paren-

1 teralmente y comúnmente se administran junto con un di-
luyente o portador farmacéuticamente aceptable. La do-
sis del factor antibiótico A-30912 dependerán de una va-
5 riedad de condiciones, tales como la naturaleza y la se-
veridad de la infección particular involucrada.

A fin de ilustrar más completamente la opera-
ción de esta invención, se proporcionan los siguientes
ejemplos.

EJEMPLO 1

10 A. Fermentación en matraz agitado

Se preparó un cultivo de *Aspergillus rugulosus*
NRRL 8113, y se mantuvo en un sesgo de agar de 18- x
150- ml., que tiene la siguiente composición:

15	Ingrediente	Cantidad (por ciento)
	Dextrina	1,0000
	Hidrolizado enzimático de caseína ^^	0,2000
	Extracto de levadura	0,1000
	Extracto de carne	0,1000
20	KCl	0,0200
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,0200
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,0004
	Agua	98,5596

^^N-Z-Amina A, Sheffield Chemical Co., Norwich, N.Y.

25 El sesgo se inoculó con *Aspergillus rugulosus*
NRRL 8113, y el sesgo inoculado se incubó a 25°C. duran-
te 7 días. El cultivo al sesgo maduro se cubrió con
suero de carne y se raspó con un lazo estéril para aflo-
jar las esporas. Se utilizó la mitad de la suspensión
30 resultante para inocular 50 ml. de un medio vegetativo

1 que tiene la siguiente composición:

	<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad (por ciento)</u>
	Sacarosa	2,5
5	Melazas	3,6
	Licor de infusión de maíz	0,6
	Hidrolizado enzimático de caseína ^^	1,0
	K_2HPO_4	0,2
	Agua	92,1

10 ^N-Z-Case, Sheffield Chemical Co., Norwich, N.Y.

El medio vegetativo inoculado se incubó en una matraz Erlenmeyer de 250 ml., de boca ancha, a 25°C durante 24 horas en un agitador que gira a través de un arco de 5 cm. de diámetro a 250 RPM.

15 Este medio vegetativo incubado puede utilizarse directamente para inocular el medio vegetativo de segunda etapa. Alternativa y preferiblemente, este puede almacenarse para empleo posterior, manteniendo el cultivo en la fase de vapor de nitrógeno líquido. El cultivo se
20 prepara para dicho almacenamiento en una multiplicidad de frascos pequeños, como sigue: En cada frasco se colocan 2 ml. de medio vegetativo incubado y 2 ml. de una solución de glicerol-lactosa que tiene la siguiente composición:

	<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad</u>
	Glicerol	20%
	Lactosa	10%
	Agua desionizada	70%

30 Las suspensiones preparadas se almacenan en la fase de vapor de nitrógeno líquido.

1 Se utilizó una suspensión almacenada (1 ml.)
así preparada, para inocular 50 ml. de un medio vegeta-
tivo de primera etapa, que tiene la misma composición
anteriormente descrita para el medio vegetativo. El
5 medio vegetativo de primera etapa inoculado se incubó
en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. de boca ancha, a 25°C.,
durante 22 horas, en un agitador que gira a través de un
arco de cinco cm. de diámetro a 250 RPM.

B. Fermentación en Tanque

10 A fin de proporcionar un volúmen mayor de inó-
culo, se utilizaron 10 ml. del medio vegetativo de pri-
mera etapa, incubado, descrito con anterioridad, para ino-
cular 400 ml. de un medio de desarrollo vegetativo, de se-
gunda etapa, que tiene la misma composición que aquella
15 del medio vegetativo. El medio de segunda etapa se in-
cubó en un matraz Erlenmeyer de boca ancha, de 2 litros,
a 25°C. durante 25 horas, en un agitador que gira a tra-
vés de un arco de 5 cm. de diámetro a 250 RPM.

20 El medio vegetativo de segunda etapa incubado
(800 ml.), preparó como se describió antes, se utilizó
para inocular 100 litros del medio de producción esté-
ril que tiene la siguiente composición:

	<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad</u>
	Glucosa	25 g/litro
25	Almidón	10 g/litro
	Peptona ^	10 g/litro
	Melazas residuales	5 g/litro
	Hidrolizado enzimático de caseína ^^	4 g/litro
	M _g SO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g/litro
30	Material mineral de Czapek. ^^^	2,0 ml/litro

	<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad</u>
1	CaCO ₃	2,0 g/litro
	Agua desionizada	c.s. 1 litro
	^ W.P. No. 159, Inolex Biomedical Corp. Glenwood, Ill.	
5	^^ N-Z-Amina A, Scheffield Chemical Co., Norwich, N.Y.	
	^^^ El material mineral de Czapek tiene la siguiente composición:	

	<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad</u>
10	FeSO ₄ · 7H ₂ O (disuelto en 2 ml. de HCl concentrado)	2 g.
	KCl	100 g.
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	100 g.
	Agua desionizada	c.s. a 1 litro

15 El pH del medio fué de 6,8 después de la esterilización mediante tratamiento en autoclave a 121°C. durante 30 minutos a aproximadamente 1,12-1.26 kg/cm² de presión. El medio de producción inoculado se dejó fermentar en un tanque de fermentación de 165 litros, a una temperatura de 25°C. durante 4 días. El medio de fermentación se aireó con aire estéril al régimen de 20 0,5 V/V/M. El medio de fermentación se agitó con agitadores convencionales a 300 RPM.

EJEMPLO 2

Separación de la Mezcla Antibiótica A-30912

25 Se agitó concienzudamente con metanol (200 l.) el caldo de fermentación entero (200 l.) obtenido mediante el método descrito en el ejemplo 1, durante 1 hora, y después se filtró, utilizando un filtro ayuda (Hiflo Super-cel, una tierra de diatomeas, Johns-Manville Products Corp.). El pH del filtrado se ajustó a un 30

1 pH de 4,0 mediante la adición de HCl 5 normal. El fil-
trado acidificado se extrajo dos veces con volúmenes
iguales de cloroformo. Los extractos clorofórmicos se
combinaron y se concentraron a vacío, a un volumen de
5 aproximadamente 4 litros. Este concentrado se agregó a
aproximadamente 60 litros de éter dietílico para preci-
pitar la mezcla de A-30912. El precipitado se separó
mediante filtración y se secó para dar 38 g. de la mez-
cla antibiótica A-30912 como un polvo gris. El filtra-
10 do se concentró a vacío para dar un aceite; este aceite
se disolvió en metanol (500 ml.). La solución metanó-
lica se agregó a éter dietílico (7,1 litros) para pre-
cipitar la mezcla adicional de antibiótico A-30912. Es-
te precipitado se separó también mediante filtración y
15 se secó para dar 3,5 g. adicionales de la mezcla anti-
biótica A-30912.

EJEMPLO 3

Aislamiento del Antibiótico A-30912 Factor A

20 Se colocó mezcla antibiótica A-30912 (20 g.),
obtenida como se describió en el ejemplo 2, sobre una
columna de gel de sílice (4-x 107- cm- Woelm) en aceto-
nitrilo:agua (95:5). La columna se eluyó con acetoni-
trilo:agua (95:5), a un régimen de flujo de 1 a 2 ml.
por minuto, recogiendo las fracciones que tienen un vo-
lumen de aproximadamente 20 ml. Las fracciones se re-
25 visaron mediante cromatografía en capa fina con gel de
sílice, utilizando el sistema disolvente de acetoni-
trilo:agua (95:5), y dió autografía de *Candida albicans*.

30 Las fracciones 74 a 125 se combinaron y se
concentraron. La solución concentrada cristalizó por

1 reposo para dar 124 mg. adicionales de esterigmatocisti-
na. Las fracciones 212 a 273 se combinaron y se concen-
traron a vacío para dar un aceite. Este aceite se di-
solvió en un pequeño volumen de metanol. La solución
5 de metanol se agregó a éter dietílico (15 volúmenes). El
precipitado que se formó, se separó, y se secó para dar
23 mg. de antibiótico A-30912 factor D. Las fracciones
274 a 437 contuvieron antibiótico A-30912 factores A,
B, C y D. Las fracciones 482 a 900 contuvieron anti-
10 biótico A-30912 factores A, E, F y G. Las fracciones
438 a 481, se combinaron y se concentraron a vacío para
dar un aceite. Este aceite se disolvió en un pequeño
volumen de metanol; y la solución de metanol se agregó
a éter dietílico (15 volúmenes). El precipitado que
15 se formó, se separó y se secó para dar 2,17 g. de anti-
biótico A-30912 factor A.

EJEMPLO 4

Aislamiento de Antibiótico A-30912 Factor D

20 Se obtuvo como se describió en el ejemplo 3
para las fracciones 274-437, una mezcla antibiótica
A-30912 parcialmente purificada que contiene el anti-
biótico A-30912 factores B, C y D. Este material (750mg)
se cromatografió sobre una columna de gel de sílice
(2,2 x 51 cm. gel de sílice Woelm), recogiendo las frac-
25 ciones que tienen un volumen de aproximadamente 15 ml.
y eluyendo con los siguientes disolventes:

<u>Fracciones</u>	<u>Disolventes</u>
1-25	acetonitrilo
26-62	acetonitrilo + 1% de agua
30 63-700	acetonitrilo + 1,5% de agua

1 Las fracciones de la columna se revisaron me-
diante cromatografía en capa fina con gel de sílice, uti-
lizando sistemas disolventes de acetonitrilo:agua (95:5)
y benceno:metanol (7:3) y bioautografía de Candida albi-
5 cans. Las fracciones 535-685, que contuvieron antibió-
tico A-30912 factor D, se combinaron y se concentraron
a vacío para dar un aceite. Este aceite se disolvió en
una pequeña cantidad de metanol y se agregó a éter dietí-
lico (15 volúmenes). El precipitado que se forma se se-
10 paró mediante filtración y se secó para dar 69 mg. de
antibiótico A-30912 factor D.

EJEMPLO 5 .

Aislamiento de A-30912 factores B y C

15 Se obtuvo un complejo antibiótico A-30912 par-
cialmente purificado que contiene A-30912 factores A, B,
C y D, según se describió en el ejemplo 3 para las frac-
ciones 212-437. Este material (18 g.) se disolvió en un
volumen mínimo de acetonitrilo:agua (4:1) y se cromato-
20 grafizó en una columna de óxido de aluminio (3,8 x 56 cm.,
Woelm), recogiendo las fracciones que tienen un volumen
de aproximadamente 20 ml. La columna se eluyó con los
siguientes disolventes:

<u>Fracciones</u>	<u>Disolvente</u>
1-300	acetonitrilo:agua (4:1)
25 301-509	acetonitrilo:agua (7:3)

30 Las fracciones de la columna se revisaron me-
diante cromatografía en capa fina con gel de sílice, co-
mo se describió en el ejemplo 4. Con base a estos re-
sultados, se combinaron las fracciones, y se concentra-
ron a aceites; los residuos oleosos se disolvieron en

1 pequeños volúmenes de metanol; las soluciones de metanol se precipitaron con 10-15 volúmenes de éter dietílico. Se resume a continuación, la forma en la cual se combinaron las fracciones, el peso del material obtenido y el contenido de factor de las fracciones combinadas.

<u>Fracción</u>	<u>Peso (g)</u>	<u>Factores</u>
6-28	0,23 ^	-
6-28	5,80	A-30912, C, D
10 34-114	2,90	A-30912 B
115-164	1,20	A-30912 A, B
165-509	1,90	A-30912 A

^ material insoluble obtenido antes de la precipitación en éter.

15 A fin de obtener A-30912 factor C, purificado, se disolvió en metanol una porción de las fracciones 6-28 (2 g.), se adsorbió en una cantidad suficiente de gel de sílice (calidad 62); se secó y se agregó a la parte superior de una columna de gel de sílice (1,9 x 20 80 cm., calidad 62), empacada en acetonitrilo. La columna se eluyó con acetonitrilo a un régimen de flujo de 2 ml./minuto, recogiendo las fracciones que tienen un volumen de aproximadamente 10 ml. En la fracción 117, el solvente cambió a acetonitrilo:agua (99:1). Las 25 fracciones de la columna se revisaron nuevamente mediante cromatografía en capa fina. Con base en los resultados de la cromatografía en capa fina, las fracciones se combinaron y se concentraron para dar residuos oleosos; los residuos oleosos se disolvieron en pequeños volúmenes de metanol; precipitándose las soluciones de metanol 30

1 con 10-15 volúmenes de éter dietílico. Se resumen a
continuación, el contenido de factor y el peso de las
fracciones de interés:

	<u>Fracciones</u>	<u>Peso (g)</u>	<u>Factores</u>
5	341-479	0,250	D
	480-540	0,015	D
	541-899	0,391	C, D
	900-1675	0,340	C

10 En resumen, la Patente de Invención que se
solicita recaerá sobre las siguientes

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para la producción de
la mezcla antibiótica A-30912, que comprende los fac-
tores A, B, C, D, E, F y G, que consiste en:

15 a) cultivar *Aspergillus rugulosus* NRRL 8113
en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables
de carbohidrato, de nitrógeno, y de sales inorgánicas,
en condiciones de fermentación aeróbica sumergida has-
ta que se produzca una cantidad sustancial de activi-
dad antibiótica; y

20 b) opcionalmente, separar la mezcla antibió-
tica A-30912 del medio de cultivo; y

c) opcionalmente, aislar el antibiótico
A-30912 factores A, B, C, D, E, F o G de la mezcla
antibiótica A-30912.

25 2.- El procedimiento de la reivindicación 1,
para la producción de antibiótico A-30912 factor A,
caracterizado por:

30 a) cultivar *Aspergillus rugulosus*;
b) separar la mezcla antibiótica A-30912 del

1 medio de cultivo; y

c) aislar el antibiótico A-30912 factor A de la mezcla antibiótica A-30912.

5 3.- El procedimiento de la reivindicación 1, para la producción de antibiótico A-30912 factor B, caracterizado por:

a) cultivar *Aspergillus rugulosus*;

b) separar la mezcla antibiótica A-30912 del medio de cultivo; y

10 c) aislar el antibiótico A-30912 factor B de la mezcla antibiótica A-30912.

4.- El procedimiento de la reivindicación 1, para la producción de antibiótico A-30912 factor C, caracterizado por:

15 a) cultivar *Aspergillus rugulosus*;

b) separar la mezcla antibiótica A-30912 del medio de cultivo; y

c) aislar el antibiótico A-30912 factor C de la mezcla antibiótica A-30912.

20 5.- El procedimiento de la reivindicación 1, para la producción de antibiótico A-30912 factor D, caracterizado por:

a) cultivar *Aspergillus rugulosus*;

25 b) separar la mezcla antibiótica A-30912 del medio de cultivo; y

c) aislar el antibiótico A-30912 factor D de la mezcla antibiótica A-30912.

30 6.- El procedimiento de la reivindicación 1, para la producción de antibiótico A-30912, factor E, caracterizado por:

1

a) cultivar *Aspergillus rugulosus*;

b) separar la mezcla antibiótica A-30912 del medio de cultivo; y

5

c) aislar el antibiótico A-30912 factor E de la mezcla antibiótica A-30912.

7.- El procedimiento de la reivindicación 1, para la producción de antibiótico A-30912 factor F, caracterizado por:

10

a) cultivar *Aspergillus rugulosus*;

b) separar la mezcla antibiótica A-30912 del medio de cultivo; y

c) aislar el antibiótico A-30912 factor F de la mezcla antibiótica A-30912.

15

8.- El procedimiento de la reivindicación 1, para la producción de antibiótico A-30912 factor G, caracterizado por:

a) cultivar *Aspergillus rugulosus*;

b) separar la mezcla antibiótica A-30912 del medio de cultivo; y

20

c) aislar el antibiótico A-30912 factor G de la mezcla antibiótica A-30912.

25

9.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE LA MEZCLA ANTIBIOTICA A-30912.

30

1

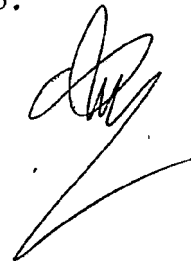
Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva, que consta de treinta y tres páginas mecanografiadas y dibujos adjuntos.

5

Madrid, 30 Septiembre 1.976

BERNARDO UNGRIA

p.p.



10

15

20

25

30

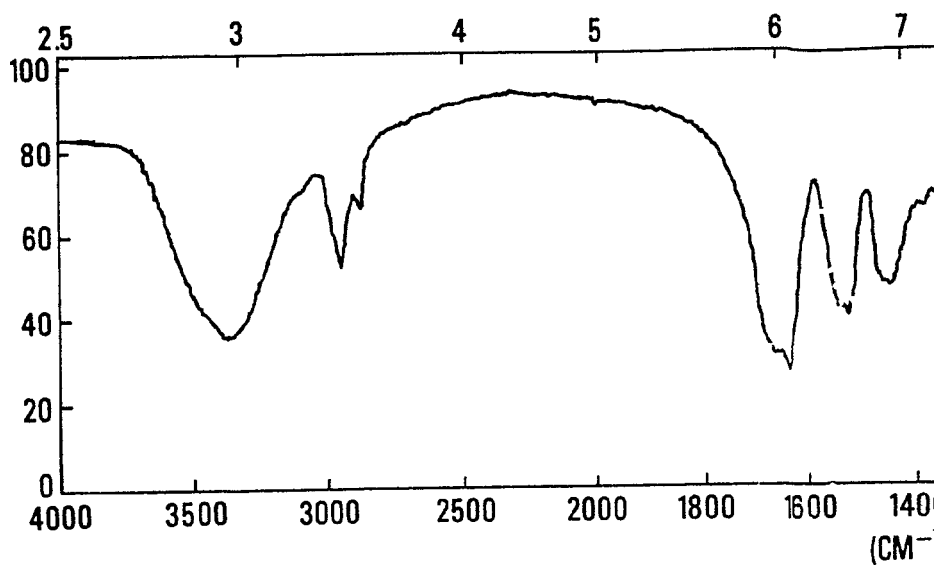


FIG. 1

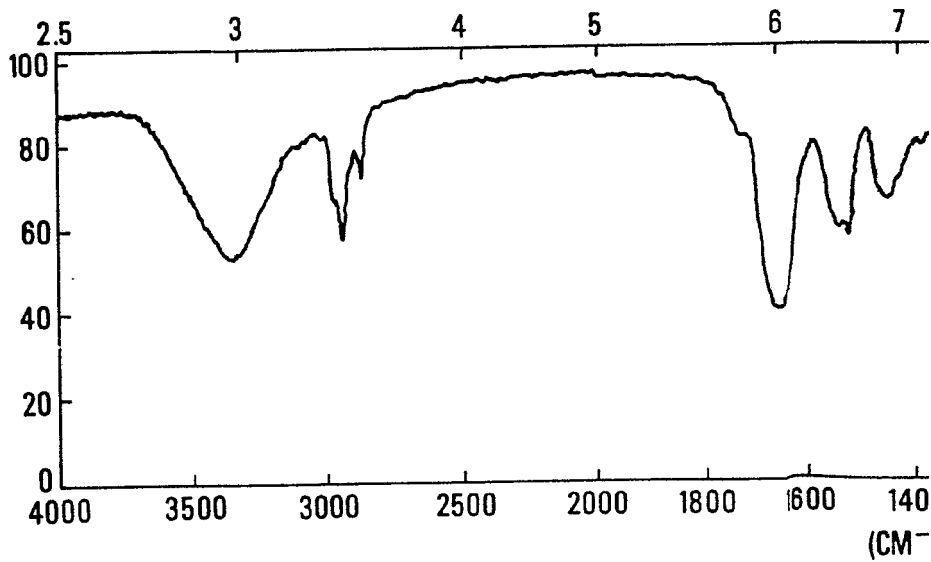


FIG. 2

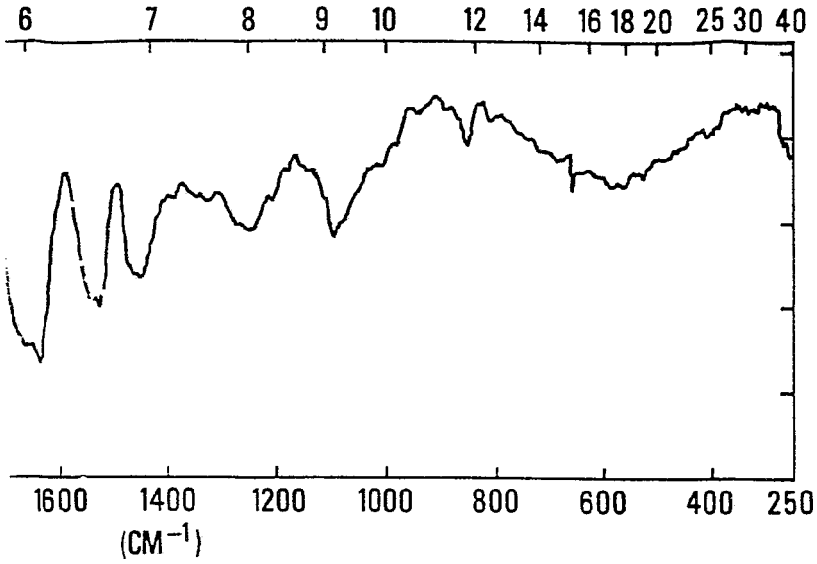


FIG. 1

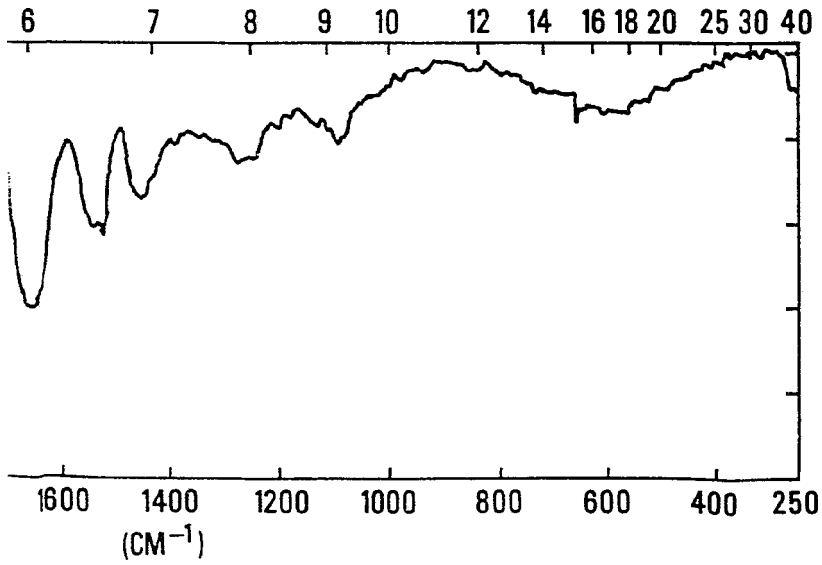


FIG. 2

ESCALA VARIABLE
Madr ., 30 Septiembre 1958
BERNARDO FIGUEROA
r.p.

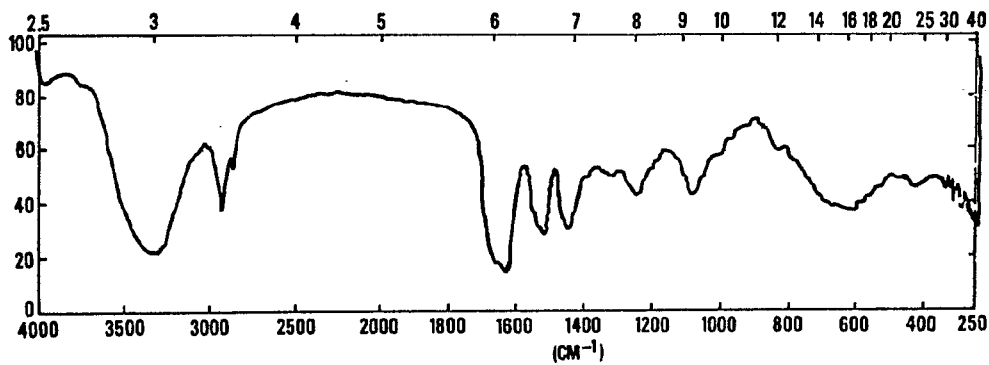


FIG. 3

ESCALA VARIABLE
Madrid, 30 Septiembre 1.977
BERNARDO UNGRIA
p.p.

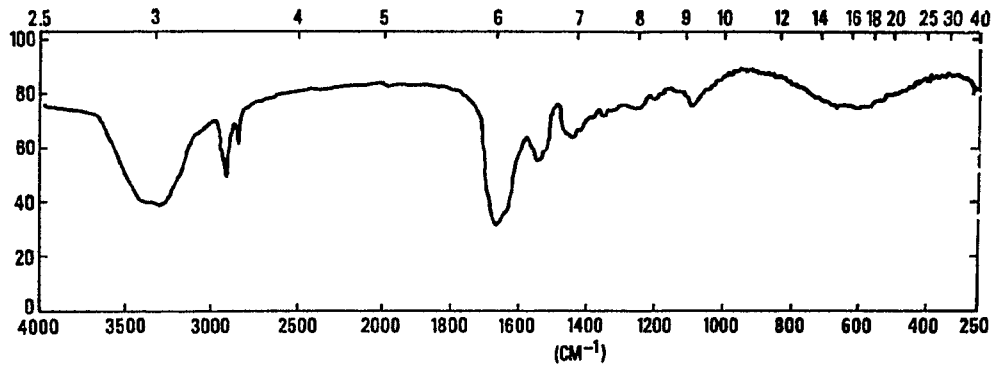


FIG. 4

ESCALA VARIABLE
Madrid, 30 Septiembre 1.976
BERNARDO UNGRIA
P.P.