



10 ES	11 NUMERO 452.022	10 A 1
21	22 FECHA DE PRESENTACION 30-9-76	

PATENTE DE INVENCION

A1 452.022 771001 C12D 9/04

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO 619.108	32 FECHA 2-10-75	33 PAIS Estados Unidos
---	---------------------	---------------------------

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

64 TITULO DE LA INVENCION
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UNA MEZCLA ANTIBIOTICA.

71 SOLICITANTE (S)
ELI LILLY AND COMPANY

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
307 East Mc Carty Street, Indianapolis, Indiana, Estados Unidos

72 INVENTOR (ES)
Calvin Eugene Higgens y Karl Heinz Michel de nacionalidades estadounidense y alemana respectivamente.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU

OF.

REF: X-4684

1 Esta invención se refiere a un procedi-
miento para preparar nuevos antibióticos de polipéptido,
designados A-22082, y otros factores menores que se produ-
cen cultivando una cepa no descrita hasta ahora del orga-
5 nismo *Aspergillus nidulans* NRRL 8112.

 Es el objeto de esta invención proporcio-
nar un nuevo procedimiento para producir una mezcla anti-
biótica que comprende el antibiótico A-22082 y otros fac-
tores menores, para separar la mezcla antibiótica que com-
10 prende el antibiótico A-22082, y otros factores menores y
aislar el antibiótico A-22082. La mezcla antibiótica se
produce cultivando una nueva cepa de *Aspergillus nidulans*
NRRL 8112 bajo condiciones de fermentación aeróbicas su-
15 mergida hasta que se produce un nivel substancial de ac-
tividad antibiótica. La mezcla antibiótica se separa del
medio de fermentación mediante extracción con disolventes
orgánicos polares. La mezcla antibiótica se purifica adi-
cionalmente, y el antibiótico A-22082 se aísla mediante
20 el empleo de una variedad de técnicas tales como cromato-
grafía.

 La presente invención proporciona un pro-
cedimiento para la producción de una mezcla antibiótica
que comprende A-22082 y otros factores menores caracteriza-
da por:

- 25 a) el cultivo de *Aspergillus nidulans* NRRL
8112 en un medio de cultivo que contiene
fuentes asimilables de carbohidrato, nitró-
geno, y sales inorgánicas bajo condiciones
de fermentación aeróbicas sumergida, hasta
30 que se produce una cantidad substancial de

actividad antibiótica por dicho organismo en el citado medio de cultivo; y

- b) opcionalmente, la separación de una mezcla antibiótica A-22082 del medio de cultivo; y
- c) opcionalmente el aislamiento del antibiótico A-22082.

El nuevo antibiótico A-22082 es un sólido amorfo blanco; el cual es soluble en metanol, etanol, dimetilformamida, sulfoxido de dimetilo, acetato de etilo y en soluciones acuosas que tienen un pH mayor que 7,0; pero que es insoluble en éter dietílico y éter de petróleo; y que tiene:

- a) un peso molecular aproximado de 1100, según se determina mediante espectrometría de masas y titulación;
- b) una composición elemental aproximada de 56,52 por ciento de carbono; 7,29 por ciento de hidrógeno, 8,68 por ciento de nitrógeno, y 27,09 por ciento de oxígeno;
- c) una fórmula empírica aproximada de $C_{51-53}H_{79-83}N_{7}O_{17-19}$;
- d) las siguientes rotaciones específicas:
 $[\alpha]_D^{25} -44^\circ$ (c0,5, CH₃OH)
 $[\alpha]_{365}^{25} -156^\circ$ (c0,5, CH₃OH)
- e) un espectro de absorción infrarroja en disco de KBr con los siguientes máximos de absorción característicos observables:
2,97 (fuerte), 3,30 (débil), 3,36 (resalto), 3,39 (medio), 3,47 (débil), 5,97 (fuerte), 6,06 (fuerte), 6,45 (medio), 6,53 (medio),

- 1 6,83 (medio), 7,78 (débil); 8,00 (débil),
9,07 (débil) y 11,66 (débil) micras;
- 5 f) espectros de absorción ultravioleta tanto
en metanol neutro como ácidos, con máximos
de absorción a 225 nm (épsilon 18.000),
275 nm (épsilon 3.000) y 284 nm (resalto,
épsilon 2.500) y máximos de absorción en
metanol básico a 245 nm (épsilon 16.000)
y 290 nm (épsilon 3.000);
- 10 g) un espectro de resonancia magnética nuclear
de C^{13} en paradeuterometanol con las si-
guientes características:
15 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, 30,2, 28,2, 27,0, 26,5, 23,6, 20,1,
19,6, 14,4, y 11,3, ppm;
- 20 h) un grupo titulable con un valor de pKa de
12,7 en dimetilformamida acuosa al 66%;
- i) después de la hidrólisis, un análisis de
aminoácido, el cual indica la presencia
de treonina, hidroxiprolina y otros tres
25 aminoácidos aún no identificados;
- j) un valor de R_f de 0,35 en la cromatogra-
fía en capa delgada en gel de sílice, uti-
lizando un sistema disolvente de benceno/
metanol (7:3) y bioautografía de *Candida*
30 *albicans* para detección;

1 k) Los siguientes valores de R_f en los sistemas cromatográficos en papel se indican a continuación, utilizando bioautografía de *Candida albicans* para detección:

5

<u>Valor de R_f</u>	<u>Sistema Solvente</u>
0,76	Butanol saturado con agua
0,69	Butanol saturado con agua más ácido p-toluensulfónico al 2%
10 0,75	Metanol:HCl 0,1 normal (3:1)
0,17	Butanol:etanol:agua (13.5:15:150)
15 0,78	Metanol:citrado de sodio 0,05 molar a un pH de 5,7 (7:3); papel tamponado con citrato de sodio 0,05 molar a un pH de 5,7.

El análisis elemental del antibiótico

20 A-22082 corresponde especialmente bien con una fórmula empírica de $C_{52}H_{81}N_7O_{18} \cdot H_2O$ (calculado: C, 56,24; H, 7,54; N, 8,84; O, 27,39).

25 Se presenta en el dibujo anexo el espectro de absorción infrarroja el antibiótico A-22082 en un disco de KBr.

El antibiótico A-22082 es similar a, pero tiene un espectro diferente de actividad del antibiótico de polipéptido Echinocandín B reportado por F. Benz y otros, *Helv. Chim. Acta* 57, 2459-2477 (1974).

30 Un organismo útil para la preparación del antibiótico A-22082 se clasifica como una cepa de *Asper-*

1 gillus nidulans (Eidam). Wint., el cual está en el grupo de la forma Aspergillus nidulans. Esta clasificación se basa en las descripciones de K.B. Raper y D.I. Fennel en "The Genus Aspergillus", The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Md., 1965.

5 Los nombres de color se asignaron de conformidad con el método de ISCC NBS (K.L. Kelly y D.B. Judd, "The ISCC NBS Method of Designating Color and 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 A. Maerz y M.R. Paul en "Dictionary of Color", McGraw-Hill Book Company, Nueva York, N.Y., 1950.

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

CARACTERISTICAS DEL CULTIVO DE A. NIDULANS

NRRL 8112

Agar en solución de Czapek

20 Cuando se desarrolla a 25°C. durante dos semanas, el cultivo obtiene un diámetro de 4,0 cm. La colonia es rugosa y tiene un margen fuertemente dentado que consiste de hifas amarillo parduscas profundamente sumergidas. A veces se presenta un exudado incoloro que con el tiempo se transforma en rosáceo. Se presentan grupos miceliales casi redondeados flojamente tejidos, aleatoriamente sobre la superficie y en una línea submarginal. A medida que estos grupos maduran, se tejen más apretadamente y se entrelazan con, y eventualmente se envuelven en, células de envoltura. Los desarrollos iniciales varían de blanco a color de ante, transformándose en

25

30

1 verde-amarillo pálido (ISCC-NBS 12 y Maerz y Paul 10-A-1).
En dos semanas, el desarrollo se hace amarillo-anaranja-
do pálido (ISCC-NBS 73 y Maerz y Paul 10-B-3). Después
de tres semanas, las cabezas de los conidios se disemi-
5 nan ampliamente, presentándose a veces en parches, son
de blanco a amarillo claro inicialmente, haciéndose des-
pués amarillos grisáceos oscuros (ISCC-NBS 91 y Maerz
y Paul 13-11-1). No se desprende pigmento soluble. La
colonia ligeramente curvada cambia inversamente de blan-
co a café claro (ISCC-NBS 57 y Maerz y Paul 5-A-10) y
10 se oscurece con la edad a matices púrpura oscuros.

Las cabezas de conidios son al principio
radiadas, pero se hacen cortas y en columnas con la edad.
Las cabezas redondeadas jóvenes pueden ser hasta de un
15 diámetro de 70 micras, pero promedian 60 micras. Las ca-
bezas en columnas son de 75 micras a 125 micras de lon-
gitud y de 30 micras a 65 micras de ancho y promedian 95
micras x 47 micras.

Los conidióforos, vesículas y fialidas son
20 de pared uniforme y de color café pálido. Los conidio-
foros varían en longitudes de 38 micras a 56 micras; pero
pueden obtener 85 micras. Son de un ancho de hasta 5 mi-
cras.

Las vesículas son de subredondeadas a hemis-
25 féricas y pueden aplastarse terminalmente. Son general-
mente de 8 micras a 11 micras de diámetro, pero prome-
dian 9,6 micras.

Los esterigmatos son biseriados, y los es-
30 terigmatos secundarios están frecuentemente en pares. Los
esterigmatos primarios son casi cuneiformes. Varían en

1 longitud de 3,2 micras a 6,3 micras y promedian 4,4 micras. En su punto más ancho son de 2,8 micras. Los esterigmátos secundarios adoptan la forma de matraz y son alargados. Son de 3,4 micras en su punto más ancho y se ahúsan a una anchura de 1 micra. Varían de longitud de 4,7
5 micras a 7,9 micras y promedian 6,2 micras.

Los conidios son rugosos, redondeados, de amarillo a verde en masse, y varían de 1,6 micras a 4,6 micras de diámetro, promediando 2,5 micras.

10 El estado ascógeno se incrustó en las células de envoltura en la superficie de la colonia pero puede también encontrarse a niveles por debajo de la superficie. Las células de envoltura son hialinas y pueden hacerse de rosáceas a parduscas a medida que se desarrolla la cleistotecia. Las células de envoltura son de redondeadas a subredondeadas o de ovaladas a alargadas y, son en general de 14 micras a 18 micras de diámetro. Las cleistotecias son redondeadas, de pared delgada y son hialinas cuando son jóvenes y púrpura obscuro cuando están
15 totalmente maduras. Varían de 185 micras a 320 micras de diámetro y promedian 200 micras.

20 Las ascas son hialinas, de redondeadas a ovaladas, y pueden desintegrarse antes de que la cleistotecia madure. Las ascas redondeadas son de 12,6 micras de diámetro. Las ascas ovaladas promedian 14,1 micras x 11,1 micras y varían de 12,6 micras a 17,4 micras de longitud y de 9,5 micras a 12,6 micras de ancho.

25 Las ascósporas son de paredes uniformes, anaranjadas, y están adornadas con dos crestas ecuatoriales paralelas delicadamente plegadas, las cuales son con-
30

1 tίνuas y son de un ancho de 0,8 micras. Si la cresta es
ecuatorial, esta está a través del eje longitudinal de
una ascóspora lenticular que es de 4,3 micras a 5,1 mi-
5 cras de longitud y de 2,7 micras a 3,5 micras de ancho
y promedian de 4,5 micras a 3,2 micras. Si la cresta es
periférica, la ascóspora aparece redondeada, y el cuerpo
tiene un diámetro igual a la longitud de la vista lenti-
cular.

Agar de Extracto de Malta

10 Cuando se desarrolla a 25°C., el cultivo se
desarrolla rápidamente, logrando un diámetro de 5 cm. en
diez días y de hasta 7 cm. en tres a cuatro semanas. Las
colonias son vellosas, amarillo verdosas. Al séptimo día
se presentan pequeños aglomerados blancos de células de
15 envoltura aleatoriamente sobre la superficie y en una
banda submarginal. Los aglomerados de célula de envoltu-
ra se hacen de un color amarillo oscuro con la edad. La
periferia de la colonia dentada, consiste de hifas café
amarillentas profundamente sumergidas. En general, la su-
20 perficie es verde olivo moderado (ISCC-NBS 125 y Maerz y
Paul 24-L-1), y el inverso de la colonia es de color oli-
vo moderado (ISCC-NBS 107 y Maerz y Paul 15-L-4).

25 Los estados de conidios y los estados ascó-
genos son similares a aquellos del agar de la solución
de Czapek con varias excepciones. Las vesículas son más
pequeñas, variando de 6,3 micras a 11,0 micras de diá-
metro y promediando 8,7 micras. Las ascas redondeadas son
de 11,0 micras de diámetro y las ascas son de 11,1 micras
a 12,6 micras de longitud y de 9,5 micras a 10,3 micras
30 de ancho, promediando 11,3 micras x 10,1 micras. Las as-

cósporas promedian 4,0 micras x 3,2 micras.

1
5
10
15
Ciertas características de la cepa productora del antibiótico A-22082 de *Aspergillus nidulans* NRRL 8112 difieren de las características del organismo descrito por Raper y Fennel, anteriormente. La cepa productora de A-22082 produce conidiofóras más pequeñas, conidios y células de envoltura, pero siendo las cabezas de los conidios ligeramente más grandes y los esterigmatos secundarios. La cepa productora de A-22082 produce un exudado, mientras que el organismo descrito por Raper y Fennell no lo hace. Todas las otras características se conforman con aquellas de la descripción publicada y confirman la identificación del organismo que produce A-22082 como una nueva cepa de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Wint.

20
25
30
El cultivo de *Aspergillus nidulans* útil para la producción de la nueva mezcla antibiótica que comprende antibiótico A-22082 y otros factores menores se ha depositado y forma parte de la colección de cultivos de muestra del Northern Regional Research Laboratory, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Agricultural Research Service, Peoria, Illinois 61604. El cultivo de *Aspergillus nidulans* es disponible al público bajo el número NRRL 8112.

El compuesto conocido de esterigmatocistina se produce por *Aspergillus nidulans* NRRL 8112. Durante el procedimiento de recuperación, la esterigmatocistina se extrae junto con las mezclas antibióticas mediante extracción de los medios de fermentación con disolventes orgánicos polares. Las mezclas antibióticas se separan

1 de la esterigmatocistina mediante técnicas de precipita-
ción.

5 La separación de la mezcla antibiótica
que comprende el antibiótico A.22082 y otros factores me-
nores de los otros componentes de los medios de fermenta-
ción utilizan la adsorción en una columna del gel de síli-
ce y la elución con acetonitrilo:agua (97:3). El antibió-
tico A-22082 se aisló de los otros factores menores median-
te separación cromatográfica en una columna de gel de sí-
lice con elución con acetonitrilo:agua (97:3).
10

El medio de cultivo empleado para desa-
rrollar *A. nidulans* NRRL 8112 puede ser cualquiera de un
número de medios. Para economía en la producción, rendi-
miento óptimo y facilidad de aislamiento de producto, sin
15 embargo, se prefieren ciertos medios de cultivo. De esta
manera, por ejemplo, una fuente de carbohidrato preferida
en la fermentación en gran escala en la sacarosa, aunque
pueden emplearse la glucosa, la maltosa, el glicerol y pro-
ductos similares. Las fuentes de nitrógeno preferidas son
20 la caseína hidrolizada con enzima y el licor de infusión
de maíz.

Pueden incorporarse sales inorgánicas nu-
tritivas en el medio de cultivo. Estas incluyen las sales
solubles acostumbradas capaces de producir sodio, mag-
nesio, calcio, amonio, cloruro, carbonato, sulfato, nitra-
to e iones similares. Los elementos en huellas esencia-
les para el desarrollo y crecimiento del organismo, ne-
cesarios, deben también ser incluidos en el medio de cul-
tivo. Dichos elementos en huellas se presentan comúnmente
30 como impurezas en otros constituyentes del medio en

1 cantidades suficientes para cumplir con los requerimientos del crecimiento del organismo.

5 Puede ser necesario agregar pequeñas cantidades (esto es 0,2 ml/l) de un agente antiespumante tal como polipropilenglicol a los medios de fermentación en gran escala, si la espuma se transforma en un problema.

10 Para la producción de una cantidad substancial de antibiótico A-22082, se prefiere la fermentación aeróbica sumergida. Pueden obtenerse pequeñas cantidades antibióticas A-22082 mediante cultivo en matraz agitado. Debido al retraso de tiempo en la producción antibiótica, comúnmente asociado con la inoculación de grandes tanques con la forma de spora del organismo, es preferible emplear un inóculo vegetativo. El inóculo vegetativo se prepara inoculando un pequeño volumen de medio de cultivo con la forma de spora o fragmentos miceliales del organismo para obtener un cultivo del organismo fresco activamente en desarrollo. 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.

25 El *A. nidulans* puede desarrollarse a temperaturas entre aproximadamente 20°C. y aproximadamente 40°C. La producción óptima de A-22082 parece ocurrir a temperaturas de aproximadamente 25-30°C.

30 Como es usual en los procedimientos de cultivo aeróbico sumergido, el medio de cultivo se airea mediante rociado con aire estéril mientras se agite mecá-

1 nicamente a través de impulsores de turbina convencio-
nales en un recipiente totalmente provisto de desviacio-
nes. La producción antibiótica eficiente se obtiene
cuando el contenido de oxígeno disuelto del medio se
5 mantiene en, o superior a 35 por ciento de saturación
de aire.

La producción del antibiótico A-22082 pue-
de seguirse durante la fermentación mediante el proba-
do de muestras de extractos alcohólicos del caldo ente-
ro en cuanto a actividad antibiótica contra un organis-
10 mo que se conoce es sensible al antibiótico. Un organis-
mo de ensayo útil para probar la presencia del antibió-
tico A-22082 es *Candida albicans*. El bioanálisis se lle-
va a cabo convenientemente mediante análisis de disco-
15 papel sobre placas de agar.

En términos generales, la actividad antibió-
tica es detectable en el tercer día de la fermentación.
La producción máxima de la actividad antibiótica usual-
mente ocurre entre aproximadamente el cuarto y el sexto
20 días con *A. nidulans*.

El antibiótico A-22082 es un agente antifun-
gico. La actividad antifúngica del antibiótico A-22082
se demostró mediante pruebas in vitro. La actividad anti-
fúngica se midió a través del método convencional de di-
25 fusión en disco (se sumergieron almohadillas de 6 mm. en
soluciones que contienen antibiótico A-22082; las al-
mohadillas se colocaron en placas de agar sembradas con
el organismo de prueba). El cuadro II resume la concen-
tración inhibitoria mínima (CIM) por disco a la cual el
30 antibiótico A-22082 inhibió los organismos representati-

1 vos.

CUADRO II

<u>Organismo de prueba</u>	<u>CIM (meg/disco)</u>
Candida albicans	0,625
5 Trichophyton mentagrophytes	0,078
Candida tropicalis	3,12

Las pruebas de difusión en disco in vitro indica también que el antibiótico A-22082 inhibe Geotrichum candidum y cuatro especies de Microsporium.

10 La actividad antifúngica del antibiótico A-22082 se demostró adicionalmente en pruebas in vivo. Cuando se administraron dos dosis de antibiótico A-22082 a ratones infectados con Candida albicans, se probó la protección contra C. albicans. Una medida de la protección producida es el valor de DE₅₀ [la dosis efectiva en mg./kg. que protege el 50% de los ratones; ver W. Wick y otros., J. Bacteriol. 81, 233-235 (1961)]. Los valores de DE₅₀ para el antibiótico A-22082 contra Candida albicans en ratones, fueron de 30 mg./kg. (administración intraperitoneal) y de 50 mg/kg. (administración subcutánea).

20 No hubo señales de toxicidad aguda cuando el antibiótico A-22082 se administró intraperitonealmente (ip) o subcutáneamente (SC) a ratones a 100 mg/kg. dos veces por día durante tres días (un total de 600 mg/kg). Tampoco hubo señales de toxicidad aguda cuando el antibiótico A-22082 se administró intraperitonealmente a ratones a 200 mg/kg., tres veces durante 24 horas (un total de 600 mg/kg.).

30 Cuando se utilizó como un agente antifungi

1
 5
 co, el antibiótico A-22082 se administró parenteralmente, y comúnmente se administra junto con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. La dosis del antibiótico A-22082 dependerá de una variedad de factores, tales como la naturaleza y la severidad de la infección particular involucrada.

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

EJEMPLO 1

10
 A. Fermentación en matraz agitado de una mezcla antibiótica que comprende el antibiótico A-22082 y otros factores menores, utilizando A. nidulans NRRL 8112

15
 Se preparó un cultivo de *Aspergillus nidulans* NRRL 8112 y se mantuvo en un sesgo de agar que tiene la siguiente composición:

<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad</u>
Pasta de tomate	2 por ciento
Harina de avena para bebé	2 por ciento
20 Agar	2 por ciento
Agua desionizada	94 por ciento

25
 El sesgo se inoculó con *Aspergillus nidulans* NRRL 8112, y el sesgo inoculado se incubó a 25°C. durante aproximadamente 7 días. El cultivo al sesgo maduro se convirtió a suero de carne y se raspó con un lazo esteril para aflojar las esporas. La suspensión resultante se liofilizó en seis píldoras.

30
 Una píldora liofilizada así preparada se utilizó para inocular 50 ml. de un medio vegetativo que tiene la siguiente composición:

	<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad (por ciento)</u>
1	Glucosa	1,0
	Glicerol	1,0
	Harina de orujo de al-	
5	godón	2,5
	CaCO ₃	0,1
	Agua	95,4

El medio vegetativo inoculado se incubó en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. a 25°C. durante 48 horas, en un agitador que gira a través de un arco de cinco cm. de diámetro a 250 RPM.

B. Fermentación en tanque de mezcla antibiótica que comprende el antibiótico A-22082 y otros factores menores utilizando A. nidulans NRRL 8112.

A fin de proporcionar un gran volumen de inóculo, se utilizaron 10 ml. del medio vegetativo incubado descrito anteriormente, para inocular 200 ml. de un medio de desarrollo vegetativo de segunda etapa que tiene la misma composición que aquella del medio vegetativo. Dicho medio de segunda etapa se incubó en un matraz Erlenmeyer de boca amplia de 2 litros, a 25°C. durante 48 horas en un agitador que gira a través de un arco de 5 cm. de diámetro a 250 RPM.

El medio vegetativo de segunda etapa incubado (800 ml.) preparado como se describió antes, se utilizó para inocular 100 litros de medio de producción esteril que tiene la siguiente composición:

	<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad (por ciento)</u>
	Sacarosa	2,0
30	Maltosa	1,0

1	Extracto de malta	1,0
	Melazas	0,5
	Licor de infusión de maíz	0,5
	Hidrolasa enzimática de caseína	0,5
5	Agua	94,5

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

10 El pH del medio fue de 7,1 después de la esterilización mediante tratamiento en autoclave a 120°C. durante 30 minutos a una presión de 6,8-9,0 kg. de presión. El medio de producción inoculado se dejó fermentar en un tanque de fermentación de 165 litros durante cinco días a una temperatura de 25°C. El medio de fermentación se aireó con aire estéril al régimen de 0,4 V/V/M y se agitó con agitadores convencionales a 250 RPM.

15 EJEMPLO 2

Separación de la mezcla antibiótica que comprende antibiótico A-22082 y otros factores menores.

20 El caldo de fermentación entero (200 litros) obtenido como se describió en el ejemplo 1, se filtró utilizando un filtro ayuda (Hyflo Super-cel, una tierra de diatomeas, Johns Manville Products Corp). Los micelios separados se extrajeron con metanol (100 litros).
25 El extracto metanólico se concentró bajo vacío a un volumen de aproximadamente 50 litros. El extracto de metanol concentrado se acidificó a un pH de 3,5-4,0 mediante la adición de ácido clorhídrico. La solución resultante se extrajo dos veces con 1/2 volúmenes de cloroformo. Los extractos clorofórmicos se combinaron y
30

1 se concentraron a un volumen de aproximadamente un litro.

5 Se agregó una porción de este concentrado de cloroformo (250 ml.) a acetonitrilo (100 ml.). La solución resultante se filtró, y el filtrado se concentró bajo vacío a un volumen de aproximadamente 150 ml. Este filtrado concentrado se aplicó a una columna de gel de sílice (5,5 x 54 cm.; gel de sílice Woelm). La columna se eluyó con acetonitrilo: agua (97:3) a un régimen de flujo de 5 ml. por minuto, recogiendo las fracciones que tienen un volumen de aproximadamente 10 ml. La elución se revisó mediante cromatografía en capa delgada con gel de sílice, utilizando un sistema disolvente de benceno:metanol (7:3). La presencia de la mezcla antibiótica que comprende el antibiótico A-22082 y otros factores menores, se detectó mediante bioautografía utilizando *Candida albicans*. Las fracciones de la columna 136-190, contuyeron la mezcla antibiótica. Estas fracciones se combinaron y se evaporaron bajo vacío para dar 453 mg. de la mezcla antibiótica.

EJEMPLO 3

Aislamiento del Antibiótico A-22082

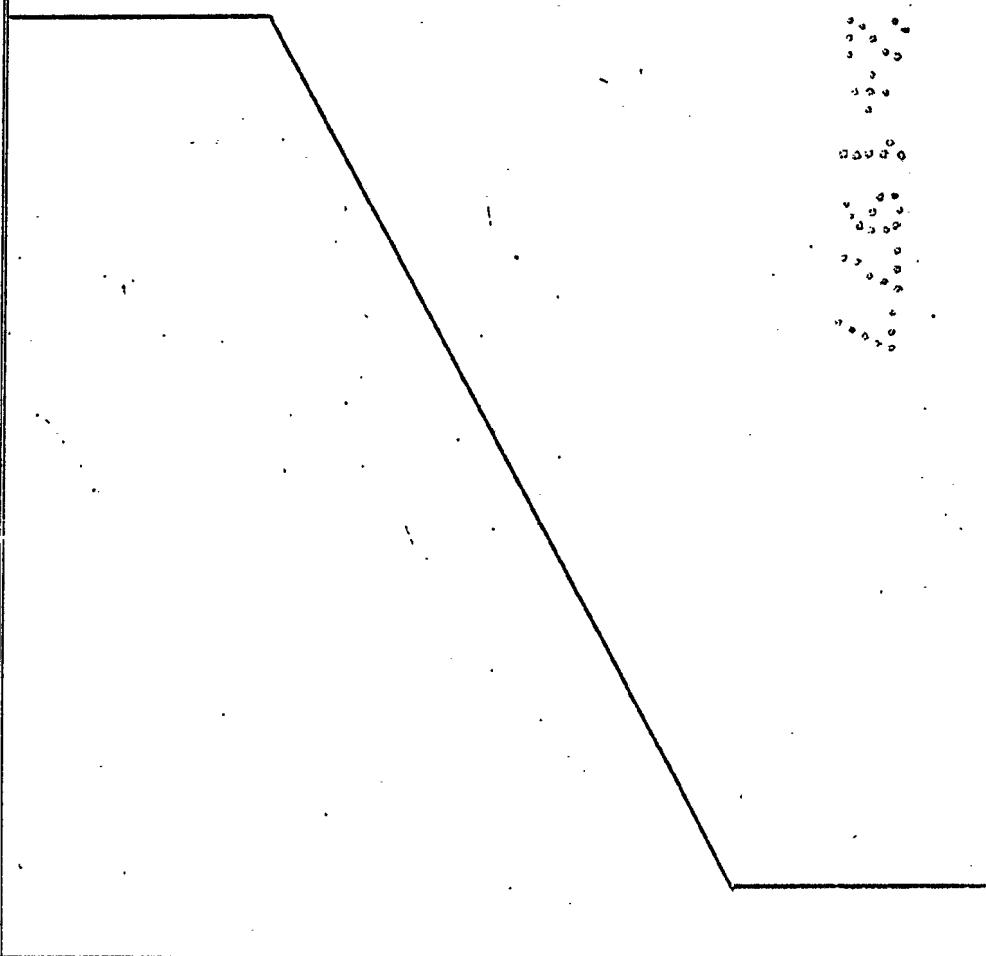
25 Se cromatografió una porción de la mezcla antibiótica que comprende el antibiótico A-22082 y otros factores menores (200 mg.), obtenidos como se describió en el ejemplo 2, en una columna de gel de sílice (1,5 x 6,0 cm.; gel de sílice Woelm). La columna se eluyó con acetonitrilo: agua (95:5) a un régimen de flujo de un ml. por min. recogiendo fracciones de 5 ml. Las fracciones se revisaron como se describió en el ejemplo

30

1
5
10
15
20
25
30

2. Las fracciones 1-3 que contuvieron el antibiótico A-22082 se combinaron y se concentraron bajo vacío a un aceite. Este aceite se cromatografió nuevamente sobre una columna de gel de sílice (1,5 x 12 cm; gel de sílice Woelm), eluyendo con acetonitrilo:agua (97:3). Se combinaron las fracciones 15-20 que contuvieron antibiótico A-22082 y se concentraron bajo vacío a un aceite. Este aceite se disolvió en metanol (2ml.); la solución de metanol se agregó a éter dietílico (20 ml.). El precipitado que se formó se separó mediante filtración y se secó para dar 35 mg. del antibiótico A-22082.

En resumen, la Patente de Invención, que se solicita, deberá recaer sobre las siguientes:



REIVINDICACIONES

1
5
10
15
20
25

1.- Un procedimiento para la producción de una mezcla antibiótica, que comprende antibiótico A-22082 y otros factores menores, caracterizado por:

- a) el cultivo de *Aspergillus nidulans* NRRL 8112 en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de carbohidrato, nitrógeno y sales inorgánicas bajo condiciones de fermentación aeróbica sumergida hasta que se produce una cantidad substancial de actividad antibiótica mediante dicho organismo en el citado medio de cultivo; y
- b) opcionalmente, la separación de la mezcla antibiótica A-22082 del medio de cultivo; y
- c) opcionalmente, el aislamiento del antibiótico A-22082.

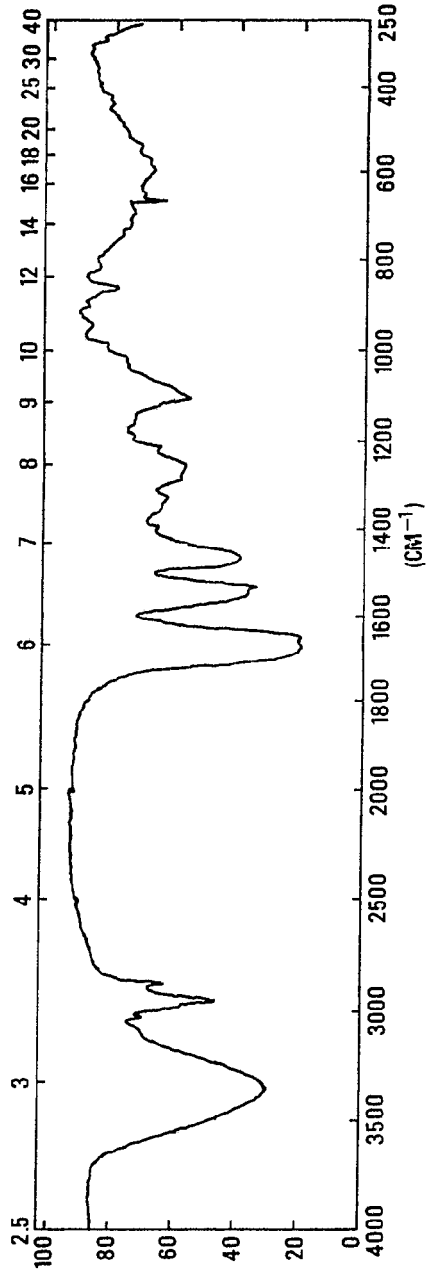
2.- El procedimiento de la reivindicación 1, para la producción del antibiótico A-22082 caracterizado por:

- a) el cultivo de *Aspergillus nidulans* NRRL;
- b) la separación de la mezcla antibiótica A-22082, del medio de cultivo; y
- c) el aislamiento del antibiótico A-22082.

3. 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 UNA MEZCLA ANTIBIOTICA.

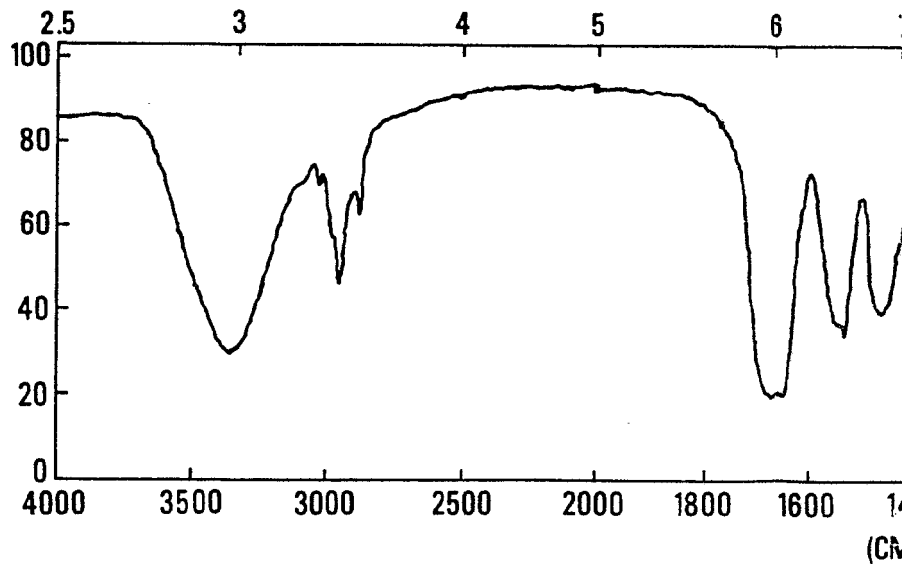
Todo conforme queda descrito y reivindicado

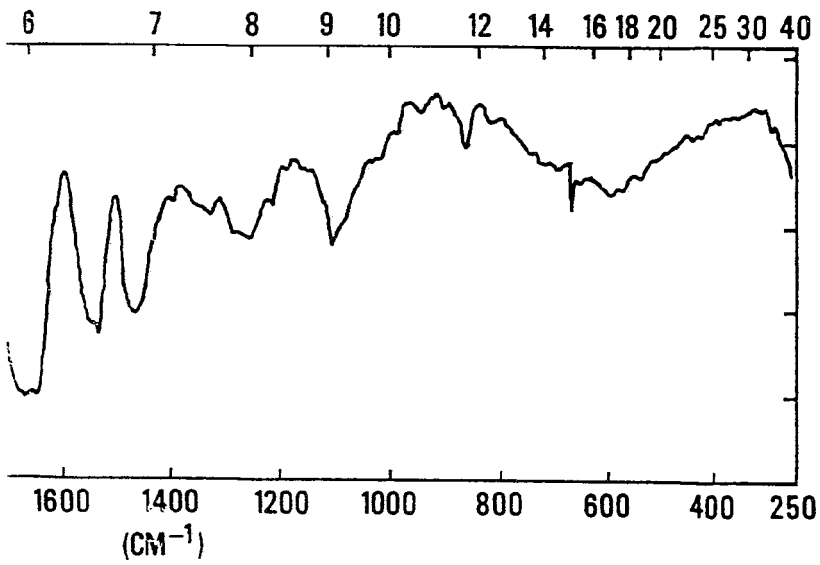
30



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

ELI LILLY AND COMPANY





ESCALA VARIABLE
Madrid, 30 Septiembre 1.976
BERNARDO UNGRÍA
P.D.