

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

19 ES

11

21

NUMERO	468.739
FECHA DE PRESENTACION	12 Abril 1978

10 A1

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
788,491	18 Abril 1977	ESTADOS UNIDOS

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C 12D	

54 TITULO DE LA INVENCION
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL ANTIBIOTICO N-ACETIL-DEHIDRO-TIENAMICINA

71 SOLICITANTE (S)
MERCK & CO., INC.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
126 East Lincoln Avenue - RAHWAY, New Jersey - ESTADOS UNIDOS

72 INVENTOR (ES)
SR. JEAN S. KAHAN

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1

RESUMEN DE LA INVENCION

El antibiótico N-acetil-dehidro-tienamicina es activo contra las bacterias gram-positivas y gram-negativas. El antibiótico se produce por cultivo de una especie de Streptomyces en un medio de fermentación adecuado.

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El descubrimiento de las notables propiedades antibióticas de la penicilina estimuló un gran interés en este campo que ha dado lugar al hallazgo de otras muchas valiosas sustancias antibióticas como estreptomycin, bacitracina, clorotetraciclina, oxitetraciclina y similares. En general, la actividad de estos antibióticos está limitada a las bacterias patógenas gram-positivas o gram-negativas. Incluso en los casos donde se obtiene un espectro más amplio de actividad antibacteriana, ciertas especies patógenas continúan siendo intrínsecamente insensibles o han adquirido resistencia en el transcurso del extenso uso de los antibióticos existentes en el tratamiento de las diversas enfermedades.

10

15

20

Por consiguiente, las deficiencias de los antibióticos conocidos han estimulado nuevas investigaciones para hallar otros antibióticos que sean activos contra una gama más amplia de patógenos así como contra las cepas resistentes de microorganismos particulares.

25

COMPENDIO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a un nuevo agente antibiótico. Más especialmente, se refiere a una nueva sustancia antibiótica denominada aquí antibiótico N-acetil-dehidro-tienamicina. La invención comprende el antibiótico en formas diluidas, como concentrados crudos y en formas puras.

30

1 Un objeto de esta invención es proporcionar un nuevo
y útil antibiótico que es muy eficaz para inhibir el creci-
miento de diversos microorganismos gram-negativos y gram-
positivos. Otro objeto es proporcionar un procedimiento para
5 la preparación de esta nueva sustancia antibiótica por fer-
mentación de medios nutritivos con el microorganismo aquí
descrito. Otros objetos resultarán evidentes en la descrip-
ción detallada de esta invención dada en lo que sigue.

10 La nueva sustancia antibiótica de esta invención es
producida cultivando en condiciones controladas el micro-
organismo Streptomyces cattleya.

15 Basándose en extensos estudios taxonómicos, el Strep-
tomyces cattleya, aislado de una muestra de tierra, ha sido
denominado MA-4297 en la colección de cultivos de MERCK & Co.,
Inc., Rahway, New Jersey. Un cultivo del mismo ha sido colo-
cado en depósito permanente en la colección de cultivos de
los Northern Regional Research Laboratories, Northern Utiliza-
tion Research and Development Division, Agricultural Research
Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois,
20 y se le ha asignado el número de accesión NRRL 8057.

25 Se sabe que el Streptomyces cattleya (NRRL 8057) produ-
ce el antibiótico tienamicina. La producción, aislamiento y
características del antibiótico tienamicina así como las ca-
racterísticas morfológicas y de cultivo del Streptomyces
cattleya están descritos en la patente estadounidense
3.950.357 que se incorpora aquí por referencia.

30 El nuevo antibiótico de la invención, N-acetil-dehidro-
tienamicina, es producido durante la fermentación aerobia de
medios nutritivos acuosos adecuados, en condiciones contro-
ladas, por inoculación con el organismo Streptomyces

1 cattleya. Son adecuados para la producción del antibiótico
N-acetil-dehidro-tienamicina los medios acuosos como los em-
pleados para la producción de otros antibióticos. Estos me-
5 dios contienen fuentes de carbono, nitrógeno y sales inorgá-
nicas asimilables por el microorganismo.

En general, pueden utilizarse hidratos de carbono como
azúcares, por ejemplo glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa,
xilosa, manitol y similares y almidones como granos, por
ejemplo avena, centeno, almidón de maíz, harina de maíz y
10 similares, sólo o en combinación, como fuentes de carbono
asimilable en el medio nutritivo. La cantidad exacta de la
fuente o fuentes de hidratos de carbono utilizada en el me-
dio depende en parte de los otros ingredientes del medio pe-
ro, en general, la cantidad de hidratos de carbono varía ha-
15 bitualmente entre alrededor del 1 y el 6 % del peso del me-
dio. Estas fuentes de carbono pueden utilizarse individual-
mente o pueden combinarse en el medio varias de estas fuen-
tes de carbono. En general, pueden utilizarse muchos mate-
riales proteicos como fuentes de nitrógeno en el proceso de
20 fermentación. Las fuentes de nitrógeno adecuadas son, por
ejemplo, los hidrolizados de levadura, levadura primaria,
harina de soja, harina de semilla de algodón, hidrolizados
de caseína, licor de infusión de maíz, solubles de destile-
ría o pasta de tomate y similares. Las fuentes de nitrógeno,
25 solas o en combinación, se utilizan en cantidades que osci-
lan aproximadamente entre 0,2 y 6 % del peso del medio acuo-
so.

Entre las sales inorgánicas nutrientes que pueden in-
corporarse a los medios de cultivo se encuentran las sales
30 habituales capaces de formar iones sodio, potasio, amonio,

1 calcio, fosfato, sulfato, cloruro, carbonato y similares.
También están incluidos los metales traza como cobalto, man-
ganés, hierro y magnesio.

5 Debe observarse que los medios descritos en los ejem-
plos son simplemente ilustrativos de la amplia variedad de
medios que pueden emplearse y no se pretende que sean limi-
tativos.

10 La fermentación se realiza a temperaturas comprendidas
aproximadamente entre 20 y 37°C; sin embargo, para obtener re-
sultados óptimos, es preferible efectuar la fermentación a
temperaturas de unos 22 a 30°C. El pH de los medios nutriti-
vos adecuados para cultivar el Streptomyces cattleya y pro-
ducir el antibiótico N-acetil-dehidro-tienamicina puede osci-
lar entre 6,0 y 8,0 aproximadamente.

15 Aunque el antibiótico N-acetil-dehidro-tienamicina es
producido en cultivos superficiales y sumergidos, se prefie-
re efectuar la fermentación en estado sumergido.

20 Una fermentación a pequeña escala del antibiótico se
realiza convenientemente inoculando un medio nutritivo adecua-
do con el cultivo productor del antibiótico y, después de
transferir a un medio de producción, permitiendo que trans-
curra la fermentación a una temperatura constante de unos
25°C en un sacudidor, durante varios días.

25 La fermentación se realiza en un matraz esterilizado
a través de una, dos, tres o cuatro fases de siembra. El me-
dio nutritivo para la fase de siembra puede ser cualquier
combinación adecuada de fuentes de carbono y nitrógeno. El
matraz de siembra se sacude en una cámara a temperatura cons-
tante de unos 28°C durante 2 días o hasta que el crecimiento
30 es satisfactorio y parte del crecimiento resultante se uti-

1 liza para inocular una segunda fase de siembra o el medio de
producción. Los matraces de siembra de fases intermedias,
cuando se utilizan, se desarrollan de forma esencialmente
idéntica; es decir, parte del contenido del último matraz de
5 siembra se utiliza para inocular el medio de producción. Los
matraces inoculados se sacuden a temperatura constante du-
rante varios días y al final del periodo de incubación el
contenido de los matraces se centrifuga o se filtra.

10 Para el trabajo a gran escala, es preferible efectuar
la fermentación en tanques adecuados provistos de un agita-
dor y un medio de aireación del medio de fermentación. Según
estè método, el medio nutritivo se prepara en el tanque y se
esteriliza calentando a temperaturas de hasta 120°C aproxi-
madamente. Después de enfriar, el medio esterilizado se ino-
15 cula con un medio de siembra previamente cultivado del cul-
tivo productor y se permite que se produzca la fermentación
durante un periodo de tiempo, por ejemplo de 3 a 5 días,
mientras se agita y/o airea el medio nutritivo y se mantie-
ne la temperatura a 25°C aproximadamente. Este método de pro-
20 ducción del antibiótico N-acetil-dehidro-tienamicina es espe-
cialmente adecuado para la preparación de grandes cantidades
del antibiótico.

PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DEL ANTIBIOTICO N-ACETIL-DEHI-

DRO-TIENAMICINA

25 La N-acetil-dehidro-tienamicina responde a la fórmu-
la empírica $C_{13}H_{16}N_2O_5S$. La composición elemental calculada
correspondiente a esta fórmula empírica es: 49,99 % de car-
bono, 5,16 % de hidrógeno, 8,97 % de nitrógeno, 25,61 % de
oxígeno y 10,26 % de azufre.

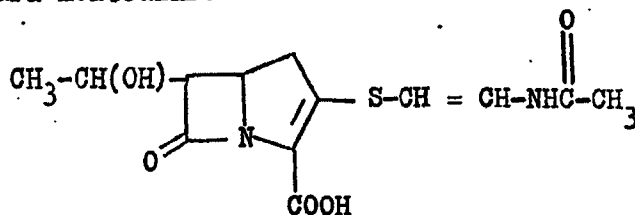
30 El espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) de

1 la N-acetil-dehidro-tienamicina a 300 MHz en D₂O revela las
siguientes señales características, donde los desplazamientos
químicos se dan en partes por millón (ppm) con respecto al
5 patrón interno 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato sódico
(DSS) y las constantes de acoplamiento en Hz:

1,29 (d, J = 6, CH₃), 2,08 (s, CH₃C=O), 3,10 (d, d,
J = 12,5, 8,7, 1H de CH₂C), 3,21 (d,d, J = 12,5, 9,5, 1H
de CH₂C), 3,39 (d,d, J = 6,0, 2,5, H₆), 4,22 (m, H₅ y H₇),
6,07 (d, J = 13,5, HC=), 7,19 (d, J = 13,5, HC=).

10 Cuando se mide el espectro de absorción ultravioleta
de la N-acetil-dehidro-tienamicina a pH 7 en soluciones acu-
sas, revela un pico a 307,5 nm y un hueco a 262 nm.

La N-acetil-dehidro-tienamicina tiene la siguiente es-
15 tructura molecular:



20 El antibiótico N-acetil-dehidro-tienamicina se carac-
teriza además por el siguiente espectro antibiótico. El en-
sayo emplea el método de difusión en disco Bauer-Kirby modi-
ficado solamente respecto a la profundidad del agar de 2 mm
empleada aquí. Los resultados, expresados como diámetro en
25 milímetros de la zona de inhibición, se encuentran en la Ta-
bla I.

TABLA I

<u>Organismo</u>		<u>0,0025 UAEH[*]/disco</u>
<u>Staphylococcus aureus</u>	2985	15,5
<u>Staphylococcus aureus</u>	2314	13,0
<u>Escherichia coli</u>	2884	13,0
<u>Escherichia coli</u>	2891	10,5
<u>Enterobacter cloacae</u>	2646	8,5
<u>Enterobacter cloacae</u>	2647	11,0

* UAEH descrito en la sección titulada "Unidades de Absorbancia Extinguibles Por Hidroxilamina".

La N-acetil--dehidro--tienamicina es un valioso anti-biótico activo contra diversas bacterias gram-positivas y gram-negativas y, por consiguiente, encuentra utilidad en medicina humana y veterinaria. El compuesto de esta invención puede utilizarse como droga antibacteriana para el tratamiento de las infecciones causadas por las bacterias gram-positivas o gram-negativas, por ejemplo contra Staphylococcus aureus, Proteus mirabilis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y Enterobacter cloacae. El material antibacteriano de esta invención puede ser utilizado además como aditivo para piensos de animales, en la preservación de alimentos y como desinfectante. Por ejemplo, puede emplearse en composiciones acuosas a concentraciones que oscilan entre 0,1 y 100 partes de antibiótico por millón de partes de solución para destruir e inhibir el crecimiento de las bacterias dañinas sobre el equipo dental y médico y como bactericida en aplicaciones industriales, por ejemplo en las pinturas al agua y en el agua blanca de las fábricas de papel para inhibir el crecimiento de las bacterias perjudiciales.

1 El antibiótico de esta invención puede utilizarse en
forma de cualquiera de los diversos preparados farmacéuticos,
como único ingrediente activo o en combinación con uno o más
antibióticos diferentes o con una o más sustancias farmaco-
5 lógicamente activas diferentes. Como ejemplo de los prime-
ros, puede coadministrarse un antibiótico de aminociclitol
como la gentamicina para reducir al mínimo cualquier riesgo
de emergencia de organismos resistentes. Como ejemplos de las
últimas, pueden combinarse el difenoxilato y la atropina en
10 dosis destinadas a la terapia de la gastroenteritis. El an-
tibiótico puede emplearse en forma de cápsulas o como table-
tas, polvos o soluciones líquidas o como suspensiones o eli-
xires. Puede administrarse por vía oral, tópica, intraveno-
sa o intramuscular.

15 Las tabletas y cápsulas para administración oral pueden
presentarse en forma de dosis unitaria y pueden contener
excipientes convencionales como agentes ligantes, por ejem-
plo jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto o
polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo lactosa, azúcar,
20 almidón de maíz, fosfato cálcico, sorbitol o glicina; lubri-
cantes, por ejemplo estearato magnésico, talco, polietilen-
glicol o sílice; desintegrantes, por ejemplo almidón de pa-
tata o agentes humectantes aceptables como laurilsulfato só-
dico. Las tabletas pueden recubrirse por métodos conocidos
25 en este campo. Los preparados líquidos orales pueden adoptar
la forma de suspensiones, soluciones o emulsiones acuosas u
oleosas, jarabes, elixires, etc. o pueden presentarse en for-
ma de producto seco para su reconstitución con agua o con
otros vehículos adecuados antes de su uso. Estos preparados
30 líquidos pueden contener los aditivos convencionales como

1 agentes suspensores, por ejemplo jarabe de sorbitol, metil-
celulosa, jarabe de glucosa/azúcar, gelatina, hidroxietil-
celulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de alumi-
nio o grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulgentes,
5 por ejemplo lecitina, monooleato de sorbitano o goma arábi-
ga; vehículos no acuosos que pueden incluir aceites comesti-
bles, por ejemplo aceite de almendras, aceite de coco frac-
cionado, ésteres oleosos, propilenglicol o alcohol etílico;
preservativos, por ejemplo p-hidroxibenzoatos de metilo o
10 propilo o ácido sórbico. Los supositorios contendrán las ba-
ses convencionales para supositorios, v.g. manteca de cacao
u otro glicérido.

Las composiciones para inyección pueden presentarse
en forma de dosis unitarias en ampollas o en envases de do-
sis múltiples con un preservativo añadido. Las composiciones
15 pueden adoptar formas como suspensiones, soluciones, emul-
siones en vehículos acuosos u oleosos y pueden contener agen-
tes de formulación como suspensores, estabilizantes y/o dis-
persantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede en-
contrarse en forma de polvo para su reconstitución con un
20 vehículo adecuado, v.g. agua estéril exenta de pirógenos,
antes de su uso.

Las composiciones también pueden prepararse en formas
adecuadas para la absorción a través de las membranas mucó-
25 sas de la nariz y de la garganta o de los tejidos bronquia-
les y pueden adoptar convenientemente la forma de nebuliza-
ciones o inhalaciones en polvo o líquidas, píldoras, unguen-
tos para la garganta, etc. Para la medicación de los ojos u
oídos, los preparados pueden presentarse como cápsulas in-
30 dividuales, en forma líquida o semisólida o pueden utilizar-

1 se como gotas, etc. Las aplicaciones tópicas pueden formularse en bases hidrófobas o hidrófilas como unguentos, cremas, lociones, pinturas, polvos, etc.

5 Asimismo, además de un vehículo, estas composiciones pueden contener otros ingredientes como estabilizantes, ligantes, antioxidantes, preservativos, lubricantes, agentes suspensores, agentes modificadores de la viscosidad o agentes saborizantes y similares.

10 En veterinaria, por ejemplo en el tratamiento de pollos, vacas, ovejas, cerdos y similares, la composición puede ser formulada, por ejemplo, como preparado intramamario en bases de acción prolongada o de liberación rápida.

15 La dosis a administrar depende en alto grado del estado del sujeto en tratamiento, del peso del huésped y del tipo de infección, de la vía y frecuencia de administración, siendo preferida la vía parenteral para las infecciones generalizadas y la vía oral para las infecciones intestinales.

20 Dentro de esta invención están incluidas las sales no tóxicas y farmacéuticamente aceptables de la N-acetil-dehidro-tienamicina, por ejemplo las sales farmacológicamente aceptables formadas con bases orgánicas e inorgánicas que incluyen, por ejemplo, las sales metálicas derivadas de hidróxidos, carbonatos o bicarbonatos de metales alcalinos o alcalino-térreos tales como las derivadas de sodio, potasio, amonio y calcio y sales derivadas de aminas primarias, secundarias o terciarias como monoalquilaminas, dialquilaminas, trialquilaminas, alcanolaminas inferiores, dialcanolaminas inferiores, alquilendiaminas inferiores, N,N-diaralquilalquilendiaminas inferiores, aralquilaminas, aminoalcanoles inferiores sustituidos, N,N-dialquil(inferior)amino-alcano-

25

30

1 les inferiores sustituidos, ácidos amino, poliamino- y guanidino-alcanoicos inferiores sustituidos y aminas heterocíclicas nitrogenadas.

5 En el tratamiento de las infecciones bacterianas en el hombre, el compuesto de esta invención se administra por vía oral o parenteral, siguiendo los procedimientos convencionales para la administración de antibióticos, en una proporción de alrededor de 2 a 600 mg/kg/día y preferiblemente alrededor de 2 a 50 mg/kg/día, preferiblemente en dosis fraccionadas, por ejemplo 3 ó 4 veces al día. Pueden administrarse en dosis unitarias que contienen, por ejemplo, 25, 250, 500 ó 1000 mg de ingrediente activo, con vehículos o excipientes adecuados fisiológicamente aceptables. Las dosis unitarias se encuentran en forma de preparados líquidos como soluciones o suspensiones o como sólidos en tabletas o cápsulas. Naturalmente, se sobreentiende que la dosis óptima en cualquier caso dado dependerá del tipo y gravedad de la infección en tratamiento y que se emplearán dosis más pequeñas para uso en pediatría, estando todos estos ajustes al alcance del experto en este campo.

15 Los caldos de fermentación que contienen el antibiótico, producidos de acuerdo con los procedimientos aquí descritos, presentan unas actividades estimadas que oscilan aproximadamente entre 0,1 y 2 µg/ml. Pueden purificarse las preparaciones de antibiótico y recuperarse el antibiótico por diversos procedimientos.

25 Uno de estos procedimientos consiste en extraer los caldos de fermentación acidulados (v.g. HCl, H₂SO₄, acético) con acetato de etilo, isobutilcetona, acetato de amilo o disolventes similares y retroextraer la fase disolvente ais-

30

1 lada en una solución acuosa mantenida a pH comprendido entre 5,5 y 7,5.

5 Puede purificarse todavía más pasando este extracto por una columna de partículas de gel de sílice con una superficie hidrocarbonada enlazada, preferiblemente C₁₈. Si se desea purificar todavía más, el eluato puede pasarse por una columna rellena con un polímero de divinilbenceno reticulado con poliestireno hidrófobo no polar, como XAD-1, 2 y 4, preferiblemente XAD-2 (fabricado por Rohm & Haas, Washington Square, Philadelphia 5, Pensilvania).

10 Un método de purificar todavía más consiste en pasar el eluato anterior en metanol al 50 % a través de una columna que contiene una resina cambiadora de anión fuertemente básica. Son ilustrativas de estas resinas las que contienen una matriz de estireno-divinilbenceno, por ejemplo la resina de amonio cuaternario nuclear de poliestireno Dowex 1x4 (fabricada por Dow Chemical Co., Midland, Michigan), en el ciclo de cloruro. Otros miembros representativos de esta clase de resinas cambiadoras fuertemente básicas son los siguientes: Duolite A-40, A-42, A-101, A-102 y A-114 (fabricadas por Chemical Process Co., Redwood City, California); Amberlite IRA-400, IRA-401 e IRA-410 (fabricadas por Rohm & Haas, Washington Square, Philadelphia, 5, Pensilvania).

25 El antibiótico contenido en el eluato puede purificarse de nuevo por filtración de gel a través de un gel de poli(acrilamida) con un tamaño de poro que excluye las moléculas con un peso molecular superior a 1800. Un gel preferido es el Bio-Gel P-2 (fabricado por Bio.Rad, Richmond, California).

30

1 Un método preferido de recuperación de la N-acetil-
dehidro-tienamicina pura consiste en extraerla del caldo aci-
dulado empleando acetato de etilo, retroextraer la fase di-
solvente separada con una solución acuosa neutra y pasar el
5 retroextracto acuoso por una columna de partículas de gel de
sílice con una superficie enlazada C_{18} . El eluato recogido
puede purificarse de nuevo por cromatografía en metanol al
50 % sobre resinas cambiadoras de anión del tipo de poliesti-
reno-trimetilamonio (v.g. Dowex 1x4 Cl - 400 mallas) y re-
10 sinas de permeación de gel (v.g. Bio-Gel P-2, 200-400 mallas).

Análisis

Los análisis de la actividad biológica se realizan de
acuerdo con el siguiente método de difusión en disco, utili-
zando Staphylococcus aureus ATCC 6538P o Vibrio percolans
15 ATCC 8461 como organismos de ensayo.

Un cultivo de una noche a 37°C de Staphylococcus
aureus ATCC 6538P en caldo nutriente más 0,2 % de extracto
de levadura (NBYE) se diluye con NBYE hasta formar una sus-
pensión que presenta una transmitancia del 40 % a una longi-
tud de onda de 660 nm. Se añaden 33,2 ml de esta suspensión
20 diluida a 1 litro de NBYE conteniendo 15 g de agar y manteni-
do a $47-48^{\circ}\text{C}$. Se vierten partes alcuotas de 10 ml de esta
suspensión en placas Petri de 85 mm de diámetro y estas pla-
cas se enfrían y se mantienen a 4°C hasta que se utilizan
25 (5 días como máximo).

Un cultivo de una noche a 28°C de Vibrio percolans
ATCC 8461 en caldo nutriente más 0,2 % de extracto de levadu-
ra (NBYE) se diluye con NBYE hasta formar una suspensión que
presenta una transmitancia del 50 % a 660 nm. Se añaden
30 33,2 ml de este cultivo diluido a 1 litro de NBYE contenen-

1 do 15 g de agar, mantenido a 46°C. Se vierten partes alícuo-
tas de 5 ml de esta suspensión sobre placas Petri de 85 mm
de diámetro y estas placas se enfrían y se mantienen a 4°C
hasta que se utilizan (5 días como máximo).

5 Las muestras de antibiótico a analizar se diluyen has-
ta una concentración apropiada y se aplican a unos discos de
1/4" (6,25 mm) o 1/2" (12,5 mm) de diámetro, aplicándose
25 µl al disco de 1/4" (6,25 mm) y 100 µl al disco de 1/2"
10 (12,5 mm). Los discos se colocan sobre la superficie de la
placa de ensayo. Las placas de Staphylococcus aureus se incu-
ban a 37°C durante la noche; las placas de Vibrio paracelsus
se incuban a 28°C durante la noche. La zona de inhibición
se mide como milímetros de diámetro y se determina el con-
tenido en antibiótico.

15 Unidades de absorbancia extinguidas por hidroxilamina (UAEH)

La proporción de absorbancia medida cerca del máximo
de absorción de ultravioleta o en el propio máximo que puede
ser atribuida al contenido en antibiótico de las muestras se
determina por la extinción selectiva de esta absorbancia
20 (con la consiguiente inactivación de la actividad antibió-
tica) por reacción con hidroxilamina diluida.

Se agrega hidroxilamina neutralizada, recién preparada
(NH₂OH.HCl más NaOH hasta un pH final de 7) a muestras sin
tamponar del antibiótico ensayado; en el caso de soluciones
25 a pH neutro, bien tamponadas, se utiliza NH₂OH.HCl sin neu-
tralizar. La hidroxilamina se agrega hasta una concentración
final de 10 mM y se deja que la reacción transcurra a la tem-
peratura ambiente durante 30 minutos como mínimo. Substra-
yendo la absorción resultante de la muestra que ha reaccio-
30 nado de la absorción de la muestra sin reaccionar (después

1 de corregir la dilución por el reactivo añadido) se obtiene la absorbancia extingible por hidroxilamina. Una UAEH de antibiótico en 1 ml presenta una absorbancia extingible por hidroxilamina de 1,0.

5 Los siguientes ejemplos ilustran los métodos de obtención de los productos de esta invención. Los ejemplos son solamente con fines ilustrativos y no deben considerarse limitativos del alcance de esta invención en modo alguno.

EJEMPLO 1

10 Se abre asépticamente un tubo de cultivo liofilizado de Streptomyces cattleya MA-4297 y el contenido se suspende en un Erlenmeyer de 250 ml, con tabiques, que contiene 50 ml de Medio A estéril de la siguiente composición:

Medio A

15

Autolizado de levadura	10,0 g
Glucosa	10,0 g
Tampón de fosfato ⁱ	2,0 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
CaCO ₃ ⁱⁱ	2,0 g
20 Agua destilada	1000 ml
pH ajustado a 6,5 con NaOH	

ⁱSolución tampón de fosfato

25

KH ₂ PO ₄	91,0 g
Na ₂ HPO ₄	95,0 g
Agua destilada	1000 ml

ⁱⁱAgregado después de ajustar el pH

30 El matraz inoculado se sacude a 28°C a 220 rpm (diámetro de la órbita circular 2 pulgadas, 5 cm) durante 30 horas. Se separan asépticamente 40 ml del caldo de 30 horas ante-

1 rior y se mezclan con 40 ml de glicerol estéril al 20 %
(en volumen). Se pipetea partes alícuotas de 2 ml de la mez
5 cla glicerólica en viales de un dracma estériles que después
se congelan y almacenan en la fase de vapor de un congelador
de nitrógeno líquido.

El contenido de un vial congelado se utiliza para ino-
cular un Erlenmeyer de 250 ml, con tabiques, que contiene
50 ml de Medio B de la siguiente composición:

Medio B

10	Autolizado de levadura	10,0 g
	Glucosa	10,0 g
	Tampón de fosfato ¹	2,0 ml
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
	Agua destilada	1000 ml
15	pH ajustado a 6,5 con NaOH.	

¹Solución tampón de fosfato

	KH ₂ PO ₄	91,0 g
	Na ₂ HPO ₄	95,0 g
20	Agua destilada	1000 ml

Este matraz de siembra se sacude a 28°C a 220 rpm
(diámetro 2 pulgadas, 5 cm) durante 48 horas. Se utilizan
partes alícuotas de 0,8 ml de este matraz de siembra para
inocular 6 Erlenmeyers de 250 ml, con tabiques, que contie-
nen 40 ml de Medio B con la misma composición que el Medio B
25 anterior. Estos 6 Erlenmeyers de 250 ml, con tabiques, se
sacuden a 28°C a 220 rpm (diámetro 2 pulgadas, 5 cm) durante
24 horas. Se agregan a cada matraz 40 ml de glicerol estéril
al 20 % (en volumen). Se pipetea partes alícuotas de 2,5 ml
30 de las mezclas resultantes en viales estériles de un dracma,
se etiquetan para identificarlos y se almacenan a -87°C.

1 Uno de los viales etiquetados congelados anteriores se descongela a 37°C y se utiliza 1 ml de su contenido para inocular un Erlenmeyer de 250 ml, con tabiques, que contiene 40 ml de Medio G de la siguiente composición:

5

Medio G

Sacarosa	30,0 g
Solubles de destilería	15,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Agua destilada	1000 ml

10

pH ajustado a 7,3 con NaOH.

15

Este matraz de siembra se sacude a 28°C a 220 rpm (diámetro: 2 pulgadas, 5 cm) durante 48 horas. Se utilizan porciones de 1 ml de este matraz de siembra para inocular cuatro Erlenmeyers de 250 ml, con tabiques, que contienen 40 ml del Medio G anterior. Estos cuatro matraces de siembra de la segunda fase se sacuden a 28°C a 220 rpm (diámetro 2 pulgadas, 5 cm) durante 24 horas.

20

Se utilizan porciones de 8 ml de estos matraces de siembra de la segunda fase para inocular 12 Erlenmeyers de 2 litros que contienen 160 ml de Medio D de la siguiente composición:

25

Medio D

Glicerol	15,0 g
Licor de infusión de maíz	15,0 g
Harina para ganado aviar	10,0 g
Solubles de destilería	15,0 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,01 g
CaCO ₃	3,0 g
Poliglicol 2000	0,25% en volumen
Agua destilada	1000 ml

30

1

pH ajustado a 7,5 con NaOH.

Estos matraces de producción se sacuden a 25°C a 150 rpm (diámetro 2 pulgadas, 5 cm) durante 5 días.

5

Se utilizan porciones de 1 ml del Medio C de los matraces de siembra de la segunda fase para inocular dos Erlenmeyers de 250 ml, con tabiques, que contienen 40 ml del Medio C antes descrito. Estos matraces de siembra de la tercera fase se sacuden a 28°C a 220 rpm (diámetro 2 pulgadas, 5 cm) durante 24 horas.

10

Se utilizan porciones de 8 ml de estos matraces de siembra de la tercera fase para inocular 7 Erlenmeyers de 2 litros que contienen 160 ml del Medio D descrito anteriormente. Estos matraces de producción se sacuden a 25°C a 150 rpm (diámetro 2 pulgadas, 5 cm) durante 4 días.

15

Se combinan los caldos de los 8 matraces fermentados durante 5 días, obteniéndose un pH de 6,75. Los caldos combinados se enfrían a 5-10°C y se centrifugan durante 15 minutos a 6000 rpm. Se filtra el líquido que sobrenada con ayuda de Super-Gel y el filtrado se conserva a 0°C.

20

Se combinan los caldos de los 6 matraces fermentados durante 4 días, cuyo pH es 6,35. Estos caldos combinados se enfrían a 5-10°C y se centrifugan durante 15 minutos a 6000 rpm. El líquido que sobrenada se filtra mediante Super-Gel. Se combinan 780 ml del caldo de fermentación de 4 días filtrado con 966 ml del caldo de fermentación de 5 días filtrado. El filtrado combinado se divide en siete porciones de 250 ml y cada una de ellas se ajusta a pH 2,5 con HCl 2,5 N y se extrae a 5°C con 250 ml de acetato de etilo. Se separa la fase de acetato de etilo y se retroextrae con 6,65 ml de MES 0,1 M (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), pH 7, su-

25

30

1 plimentado con una cantidad de NaOH 2,5 N suficiente para
llevar el pH del retroextracto acuoso a 6,8-7,2. Se separa
5 el retroextracto acuoso y las trazas residuales del acetato
de etilo se eliminan haciendo pasar una corriente de ni-
trógeno sobre la superficie.

Los retroextractos reunidos tienen un volumen total de
42,5 ml, un pH de 7,03 y contienen 12,75 UAEH medido a 307 nm.

10 Los retroextractos reunidos se concentran por roto-
evaporación hasta 7,65 ml. Se toma una muestra de 0,1 ml pa-
ra análisis y el resto se aplica a un sistema cromatográfi-
co de líquidos preparado como sigue:

15 Mediante un tubo de acero inoxidable de 6 pulgadas
(15 cm) de longitud y 0,03 pulgadas (0,76 cm) de diámetro,
se conectan entre sí dos columnas de acero inoxidable de
20 1" x 36" (2,5 x 90 cm), rellenas de Bondapak C₁₈/Porasil B,
(R) con un intervalo de tamaños de partículas de 37-75 micras.
Las columnas se sumergen en una camisa de agua y a través de
esta camisa se hace circular continuamente agua calentada a
40°C. La columna se equilibra antes de utilizarla con tampón
de fosfato potásico 0,01 M, pH 5,6/acetonitrilo 95:5 en vo-
lumen. La muestra se aplica utilizando una válvula de inyec-
ción rotatoria Altex Scientific, Inc. Modelo 202-00, provista
de un lazo de 10 ml de tubo de Teflon.

25 La columna se desarrolla con el tampón anterior a un
caudal de 8 ml cada 3 minutos y se explora a 307 nm emplean-
do el monitor de absorbancia ultravioleta Laboratory Data
Control Constametric II (R) provisto de una célula de flujo
con una longitud de la trayectoria de 1 cm. Se recogen frac-
ciones de 8 ml y a cada fracción se agregan 20 µl de K₂PO₄
30 0,1 M. Las fracciones se enfrían a 0°C y se determina la ac-

1 tividad biológica sobre placas de análisis de Staphylococcus aureus.

5 La actividad de N-acetil-dehidro-tienamicina aparece entre los 624 y los 688 ml de eluato. Estas fracciones se combinan, se ajustan a pH 6,85 con NaOH 2,5 N y se halla que
10 contienen 9,2 UAEH medido a 307 nm. Las fracciones reunidas se concentran hasta 1 ml por rotoevaporación y este ml se aplica a una columna de 1,3 x 8 cm de XAD-2 prelavado. El XAD-2 se lava previamente en columna, sucesivamente con cuatro volúmenes de columna: 1) EDTA 0,001 M, 2) NaOH 1 N, 3) agua desionizada, 4) HCl 1 N, 5) agua desionizada, 6) metanol, 7) acetona y 8) agua desionizada. Después se aplica la muestra, seguida de 1 ml de agua destilada antes de desarrollar la columna con agua destilada. Las fracciones 1-5
15 contienen 5,56 ml; las fracciones restantes son de 1 ml y se recogen a 1 ml/minuto aproximadamente. En estas fracciones se analiza la actividad biológica sobre placas de análisis de Vibrio percolans. La mayor parte de la N-acetil-dehidro-tienamicina se encuentra en las fracciones 9-30. Estas fracciones contienen 2,57 UAEH medido a 307 nm.

EJEMPLO 2

25 Un vial de MA-4297 congelado, etiquetado para identificar que contiene Streptomyces cattleya preparado de acuerdo con el Ejemplo 1, se descongela a 37°C y se utiliza 1 ml de su contenido para inocular un Erlenmeyer de 250 ml, con tabiques, que contiene 40 ml de Medio C de la siguiente composición:

30



1

Medio C

Sacarosa 30,0 g

Solubles de destilería 15,0 g

Extracto de levadura 5,0 g

5

Agua destilada 1000 ml

pH ajustado a 7,3 con NaOH.

10

Este matraz de siembra se sacude a 28°C a 220 rpm (diámetro: 2 pulgadas, 5 cm) durante 48 horas. Se utilizan porciones de 1 ml de este matraz de siembra para inocular 5 Erlenmeyers de 250 ml, con tabiques, que contienen 40 ml del Medio C anteriormente descrito. Estos matraces de siembra se sacuden a 28°C a 220 rpm (diámetro 2 pulgadas, 5 cm) durante 24 horas. Se utilizan porciones de 8 ml de estos matraces de siembra de 24 horas para inocular 16 Erlenmeyers de 2 litros que contienen 160 ml de Medio D de la siguiente composición:

15

Medio D

Glicerol 15,0 g

Licor de infusión de maíz 15,0 g

20

Harina para ganado aviar 10,0 g

Solubles de destilería 15,0 g

CoCl₂·6H₂O 0,01 g

CaCO₃ 3,0 g

25

Poliglicol 2000 0,25% en volumen

Agua destilada 1000 ml

pH ajustado a 7,5 con NaOH.

Estos matraces de producción se incuban a 25°C a 150 rpm (recorrido 2 pulgadas, 5 cm) durante 5 días.

30

Se combinan los caldos de los 16 matraces de producción,

1 se enfrían a 5-10°C y se centrifugan durante 15 minutos a
6000 rpm. Se separa el líquido que sobrenada y se filtra con
ayuda de Super-Cel. El caldo filtrado se divide en porciones
de 250 ml, cada una de las cuales se ajusta a pH 2,5 con
5 HCl 2,5 N y se extrae a 5°C con dos porciones sucesivas de
250 ml de acetato de etilo. Cada una de las fases de acetato
de etilo se retroextrae con 6,65 ml de MES 0,1 M, pH 7, más
NaOH 2,5 N suficiente (aproximadamente 0,3 ml) para llevar el
pH del retroextracto acuoso a 6,8-7,2. Los retroextractos
10 acuosos obtenidos de la primera extracción de cada porción
de caldo con acetato de etilo se etiquetan "primeros extrac-
tos"; los obtenidos de la segunda extracción con disolvente
se etiquetan "segundos extractos". El acetato de etilo re-
sidual en los extractos se elimina haciendo pasar una co-
15 rriente de nitrógeno sobre la superficie líquida. Se combi-
nan los "primeros extractos", con un volumen resultante de
67 ml, pH 7,05 y un total de 45,6 UA EH medidas a 307 nm. Se
combinan los "segundos extractos", con un volumen resultante
de 62 ml, pH 7,05 y un total de 23,6 UA EH medidas a 307 nm.
20 Los "primeros extractos" combinados se concentran a
7 ml por rotoevaporación. Se toma una muestra de 50 µl para
análisis y los 6,95 ml residuales se aplican al sistema cro-
matográfico de líquidos Bondapak C₁₈/Porasil B[®] descrito en
el Ejemplo 1. La columna se equilibra antes de utilizarla
25 con tampón de fosfato potásico 0,01 M, pH 5,6/acetonitrilo
95:5 en volumen y la columna se desarrolla con el mismo tam-
pón.
30 Se recogen fracciones de 10,5 ml cada 3 minutos hasta
que se han recogido 640 ml de eluato, a partir de cuyo mo-
mento se recogen fracciones de 5,25 ml cada 1,5 minutos. Se

1 agrega a cada fracción 20 μ l de K_2HPO_4 0,1 M y las fraccio-
nes se enfrían a 0°C y se analiza su actividad biológica so-
bre placas de análisis de Staphylococcus aureus. La mayor
5 parte de la N-acetil-dehidro-tienamicina está contenida en-
tre los 597 y los 655 ml de volumen eluido. Estas fracciones
se reúnen, se ajustan a pH 7,2 con NaOH 2,5 N y se mantienen
a 0°C.

Los "segundos extractos" combinados se concentran a
6,3 ml por rotoevaporación. Se toma una muestra de 50 μ l pa-
10 ra análisis y los 6,25 ml restantes se aplican al sistema
cromatográfico de líquidos Bondapak C_{18} /Porasil B[®], descri-
to en el Ejemplo 1. La columna se equilibra antes de utilizar-
la con tampón de fosfato potásico 0,01 M, pH 5,6/acetonitri-
lo 95:5 en volumen y la columna se desarrolla con el mismo
15 tampón.

Se recogen fracciones de unos 9 ml cada 3 minutos. A
cada fracción se agregan 20 μ l de K_2HPO_4 0,1 M y las fraccio-
nes se enfrían a 0°C y se analiza su actividad biológica so-
bre placas de análisis de Staphylococcus aureus. Las fraccio-
20 nes activas que presentan actividad de N-acetil-dehidro-tie-
namicina se combinan y se ajustan a pH 7 con NaOH. Estas
fracciones combinadas contienen 3,74 UAEH medidas a 307 nm.

Las fracciones combinadas se concentran a 0,5 ml por
rotoevaporación. Se añaden 0,5 ml de metanol. La mezcla se
25 centrifuga durante 2 minutos a 3000 rpm para separar el pre-
cipitado que se forma. El precipitado forma una fase infe-
rior de 0,05-0,1 ml. Se separa la fase superior y se aplica
a una columna Altex de 25 x 100 mm, rellena de Bio-Gel P-2,
-400 mallas, en metanol al 50 % hasta un volumen relleno fi-
30 nal de 25 mm x 75 mm. La muestra se aplica utilizando una

1 válvula de inyección rotatoria Altex Modelo 202-00 provista
de un lazo de 3 ml de tubo de Teflon. La columna se desarro-
lla con metanol al 50 % a un caudal de 3,3 ml/minuto y se
recogen fracciones de 0,55 ml aproximadamente. Las fraccio-
5 nes se enfrían a 0°C y se determina su actividad biológica
sobre placas de análisis de Staphylococcus aureus. La acti-
vidad de N-acetil-dehidro-tienamicina se encuentra entre
65 y 100 ml de eluato. Se combinan las fracciones entre 65 y
67 ml de eluato con las fracciones entre 90 y 100 ml de elua-
10 to y se concentran a 3,4 ml por rotoevaporación. Estas frac-
ciones contienen 0,4 UAEH a 307 nm. Las fracciones de Bio-
Gel entre 67 y 90 ml de eluato se combinan y se concentran
a 11,5 ml por rotoevaporación. Estas fracciones contienen
1,4 UAEH medidas a 307 nm.

15 Se combinan las dos fracciones reunidas de la columna
de Bio-Gel P-2 y se agregan a las fracciones reunidas de
N-acetil-tienamicina de la cromatografía en Bondapak C₁₈/Po-
rasil B[®] de los "primeros extractos". Esta solución contiene
7,89 UAEH medidas a 307 nm y tiene un volumen de 68 ml. Se
20 añaden 68 ml de metanol y la mezcla resultante se aplica a
una columna preparada con Dowex 1x4 Cl⁻, -400 mallas, de
1,55 x 21 cm. La columna se prepara antes de utilizarla como
sigue: la resina se define por decantación de agua, se in-
troduce en la columna en metanol al 50 % y después se lava
25 con 7-8 volúmenes de columna de NaCl 0,5 M en metanol al
50 % seguido de 7-8 volúmenes de columna de metanol al 50 %.
La solución de N-acetil-dehidro-tienamicina en metanol al
50 % de la cromatografía anterior se aplica a la columna a
razón de 1 ml/minuto seguida de 2-3 ml de metanol al 50 %.
30 La columna se desarrolla a un caudal de 1 ml/minuto con

1 NaCl 0,09 M. + NH₄Cl 0,005 M + NH₄OH 0,0003 M en metanol al
50 %, pH 7,5. Se recogen fracciones de 5 ml aproximadamente
y se analiza su actividad biológica sobre placas de análisis
de Staphylococcus aureus. La N-acetil-dehidro-tienamicina se
5 encuentra entre los 505 y los 607 ml de volumen eluido. Se
combina el volumen eluido desde 519 hasta 579 ml, que contiene
4,4 UAEH medidas a 307 nm. Estas fracciones se concentran
a 0,6 ml por rotoevaporación. Se agrega un volumen de 0,6 ml
de metanol y la mezcla se centrifuga durante 2 minutos a
10 3000 rpm.

El líquido que sobrenada se separa de la perla de sal.
Esta última se lava con 0,2 ml de metanol al 50 % y la mezcla
se centrifuga durante 2 minutos a 3000 rpm. Este líquido
sobrenadante se agrega al primer líquido sobrenadante. Esta
15 solución, que contiene 3,2 UAEH medidas a 307 nm, se aplica
a una columna de 1,65 x 37 cm de Bio-Gel P-2, 200-400 mallas,
lavada antes de utilizarla con 5 ml de NaCl saturado en metanol
al 50 %, seguido de 2-3 volúmenes de columna de metanol
al 50 %. Después de la muestra se aplican 2-3 ml de metanol
20 al 50 %. La columna se desarrolla con metanol al 50 % y se
recogen fracciones de 1,2 ml cada minuto. Las fracciones se
exploran por absorción ultravioleta a 300 nm y se observa un
pico entre las fracciones 26 y 41. Se combinan las fracciones
28-37, con una relación 307 nm/262 nm superior a 1 y se añaden
25 10 µl. de tampón de fosfato potásico 1 M, pH 7. Estas
fracciones combinadas se concentran por rotoevaporación a
1 ml aproximadamente antes de liofilizar y contienen una actividad
estimada de 2,28 UAEH medidas a 307 nm.

EJEMPLO 3

Se abre asépticamente un tubo de cultivo liofilizado de un aislado de Streptomyces cattleya MA-4297 y el contenido se suspende en un Erlenmeyer de 250 ml, con tabiques, que contiene 50 ml de Medio B de la siguiente composición:

Medio B

Autolizado de levadura	10,0 g
Glucosa	10,0 g
Tampón de fosfato [*]	2,0 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
Agua destilada	1000 ml
pH ajustado a 6,5 con NaOH	

* Solución tampón de fosfato

KH ₂ PO ₄	91,0 g
Na ₂ HPO ₄	95,0 g
Agua destilada	1000 ml

Este matraz inoculado se sacude a 28°C a 150 rpm (diámetro 2 pulgadas, 5 cm) durante 48 horas. Se utilizan porciones de 10 ml de este matraz de siembra para inocular tres Erlenmeyers de 2 litros, con tabiques, que contienen 500 ml de Medio B de la misma composición que el Medio B anterior. Estos matraces se sacuden a 28°C a 150 rpm (diámetro 2 pulgadas, 5 cm) durante 24 horas. El cultivo de estos matraces de siembra de 2 litros se utiliza para inocular un fermentador de acero inoxidable de 756 litros que contiene 467 litros de Medio E de la siguiente composición:

Medio E

Glicerol	10,0 g
Pharmamedia	5,0 g

1	Solubles de destilería	10,0 g
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
	CaCO_3	3,0 g
	Poliglicol 2000	0,25 % en volumen
5	Agua corriente	1000 ml
	pH ajustado a 7,3 con NaOH.	

Este fermentador de acero inoxidable se opera a 28°C con una velocidad de agitación de 130 rpm y un caudal de aire de 10 pies³ (28 litros)/minuto. Al cabo de 48 horas, se utilizan 454 litros de este medio para inocular un fermentador de acero inoxidable de 5670 litros que contiene 4082 litros de Medio F con la siguiente composición:

Medio F

15	Licor de infusión de maíz	15,0 g
	Glicerol	10,0 g
	Pharmamedia	5,0 g
	Solubles de destilería	10,0 g
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
20	CaCO_3	3,0 g
	Poliglicol 2000	0,25 % en volumen
	Agua corriente	1000 ml
	pH ajustado a 7,3 con NaOH.	

25 Este tanque se opera a 25°C con una velocidad de agitación de 70 rpm y un caudal de aire de 54,3 pies³/minuto (152 litros). Al cabo de 100 horas, se retiran porciones de 100 ml, se enfrían a 5-10°C y se centrifugan a 6000 rpm durante 15 minutos. El líquido que sobrenada se filtra con ayuda de Super-Cel. Una porción de 25 ml del filtrado se ajusta a pH 2,2-2,4 con HCl 5 N y se extrae a 5°C con 25 ml de ace-

30

1 tato de etilo. Se separa la fase de acetato de etilo y se
retroextrae con 2,5 ml de tampón de fosfato potásico 0,075
M, pH 7,0. Se separa la fase acuosa que contiene 925 A5 y
5 las trazas residuales de acetato de etilo se eliminan hacien-
do pasar una corriente de nitrógeno sobre la superficie lí-
quida. Un disco de media pulgada (12,7 mm) conteniendo 100
µl de retroextracto da una zona de 24,3 mm en una placa de
análisis de Staphylococcus aureus.

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

REIVINDICACIONES

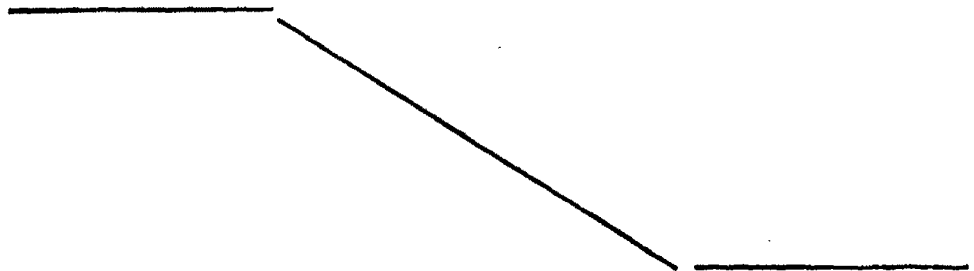
15 1.- Un procedimiento para la producción del antibió-
tico N-acetil-dehidro-tienamicina que consiste en cultivar
Streptomyces cattleya en un medio nutritivo acuoso que con-
tiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inor-
gánicas, en condiciones aerobias sumergidas y recuperar el
antibiótico.

20 2.- Un procedimiento según la Reivindicación 1ª, don-
de el organismo cultivado es Streptomyces cattleya NRRL -
8057.

25 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 DEL ANTIBIOTICO N-ACE-
TIL-DEHIDRO-TIENAMICINA.

25

30

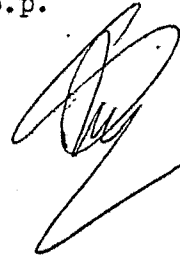


1

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

5

Madrid 12 de abril de 1978
BERNARDO UNGRIA
P.P.



10

15

20

25

30