

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA
 Registro de la Propiedad Industrial
 que tiene por objeto la
 sante descripción y según el con-
 tenido de la Memoria adjunta.



ESPAÑA

3 MAR. 1979

476480

ES	(11) NÚMERO	(10) A1
(21)	476480	
(22)	FECHA DE PRESENTACION	
	29 DIC. 1978	

PATENTE DE INVENCION

(20) PRIORIDADES:	(22) FECHA	(23) PAIS
(31) NUMERO		
160308/1977	30 Diciembre 1977	Japón

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(52) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D	— — —

(54) TITULO DE LA INVENCION

"Método de producir un antibiótico"

(71) SOLICITANTE (S)

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

27, Doshomachi 2-chome, Higashi-ku, Osaka, Japón

(72) INVENTOR (ES)

Akira Imada, Kazuaki Kitano y Mitsuko Asai

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE

M. Ourell Sufiol

F5411
EX-JA

BAD ORIGINAL

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

por VEINTE años

solicitada en España a favor de TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD., de nacionalidad japonesa, domiciliada en 27 Doshomachi 2-chome, Higashi-ku, Osaka, Japón, por "Método de producir un antibiótico", con prioridad de la solicitud japonesa 160308/1977 de fecha 30 Diciembre 1977. - - - - -

MEMORIA DESCRIPTIVA

Esta invención se refiere a un antibiótico (denominado a continuación "Antibiótico G-6302"), a sus sales y, en su aspecto reivindicado, a un método para producirlos. - - -

5.

Con el fin de hallar nuevos antibióticos, los inventores aislaron un gran número de microorganismos procedentes de muestras de suelo e investigaron los antibióticos que producían tales microorganismos. La investigación demostró

que algunos de estos microorganismos elaborarían un nuevo anti-
 biótico, que estos microorganismos pertenecían al género
Penicillium y que, al cultivarlos en un medio de cultivo ade-
 cuado, estos microorganismos acumularían un antibiótico que
 5. inhibe las bacterias grampositivas y gramnegativas. Los in-
 ventores aislaron este antibiótico y, basándose en sus pro-
 piedades fisicoquímicas y biológicas, establecieron que este
 antibiótico es un antibiótico nuevo. Por ello lo designaron
 como "Antibiótico G-6302". - - - - -

10. Se estudiaron también las condiciones para la pro-
 ducción del Antibiótico G-6302 y se descubrió que la produc-
 ción de Antibiótico G-6302 podía aumentarse significativamen-
 te por cultivo de cualquiera de estos microorganismos en un
 medio de cultivo suplementado con un compuesto de azufre que
 15. el microorganismo sea capaz de utilizar. Estos descubrimien-
 tos fueron seguidos por ulterior investigación que culminó
 en la presente invención. - - - - -

En la presente descripción y en las reivindicacio-
 nes que forman parte de esta solicitud, el Antibiótico
 20. G-6302 se denominará en algunas ocasiones, de forma simplifi-
 cada, como "G-6302". - - - - -

Por ello la invención se refiere, de manera gene-
 ral, a - - - - -

(1) El Antibiótico G-6302 y sus sales; y (2) un método para

5. producir Antibiótico G-6302 caracterizado por cultivar un microorganismo que pertenezca al género Pseudomonas y que es capaz de producir Antibiótico G-6302 en un medio de cultivo de modo que se tenga Antibiótico G-6302 elaborado y acumulado en el caldo cultivado y en recuperar el antibiótico. - - - -

10. La cepa productora del Antibiótico G-6302 empleada según esta invención puede ser cualquier cepa bacteriana del género Pseudomonas con la única condición de que sea capaz de elaborar Antibiótico G-6302. Como ejemplo de tal cepa puede mencionarse la cepa Pseudomonas G-6302 (denominada a continuación, a veces, "cepa G-6302") que fue aislada por los inventores a partir de muestras de suelo recogidas en Ashigara-Shimo-Gun, distrito de Kanagawa, Japón. - - - - -

15. Las características bacteriológicas de la cepa G-6302 de Pseudomonas son como se indica a continuación. - -

(a) Morfología:

20. Después de 2 días en un "slant" de agar nutritivo a 28°C, las células son barriformes de un diámetro de 0,7 a 1,0 μ y de una longitud de 0,7 a 3,5 μ . Sin polimorfismo, móviles con flagelos polares o con un flagelo polar. No esporulantes; no tiene lugar acumulación de ácido poli-beta-hidroxibutírico como reserva de carbono intracelular (R.Y. Stanier et al: Journal of General Microbiology 43, 159 (1966)). Gramnegativas, no sólidas a los ácidos. - - - - -

(b) Características de cultivo en varios medios:

Crecimiento a 28°C y observación durante 1-14 días.

- 5. (1) Placa de agar nutriente: Se forman después de 3 días colonias circulares en relieve de un diámetro de 1 a 3 mm, con márgenes enteros; uniformes; opacas; blancas; no produjeron pigmento difundible. -
- (2) Slant de agar nutriente: crecimiento moderado, filiformes, opacas y de color crema. - - - - -
- 10. (3) Caldo nutriente: crecimiento turbido, substancialmente sin sedimentación. Aparece una película después de 14 días de cultivo. - - - - -
- (4) Stab de gelatina nutriente: crecimiento superficial, sin licuefacción. - - - - -
- (5) Leche de litmus sin cambio. - - - - -

15. (c) Características fisiológicas:

- (1) Reducción de nitratos: negativa - - - - -
- (2) Denitrificación: negativa - - - - -
- (3) Ensayo RM (rojo de metilo): negativo - - - - -
- (4) Ensayo VP (Voges-Proskauer): negativo - - - - -

- (5) Producción de indol: negativa - - - - -
- (6) Producción de sulfuro de hidrógeno: positiva (débil) - - - - -
- (7) Hidrólisis del almidón: negativa - - - - -
- 5. (8) Utilización de citrato: positiva - - - - -
- (9) Utilización de fuentes inorgánicas de nitrógeno
 - I) Nitrate potásico: Negativa a débilmente positiva - - - - -
 - II) Sulfato amónico: positiva - - - - -
- 10. (10) Producción de pigmentos: ninguna - - - - -
- (11) Ureasas: positiva - - - - -
- (12) Oxidasas: negativa - - - - -
- (13) Catalasa: positiva - - - - -
- (14) Gama de crecimiento - - - - -
 - 15. I) pH: crecimiento a pH 4-8, pH óptimo 4,5-6,0 -
 - II) Temperaturas: crecimiento a 2-37°C, temperatura óptima 25-30°C - - - - -
- (15) Demanda de oxígeno: aeróbicas - - - - -

- (16) Ensayo O-F (de oxidación-fermentación), método (Hugh-Leifson): oxidantes - - - - -
5. (17) Producción de ácido y gas a partir de azúcares: se observa débil producción de ácido pero ninguna producción de gas en peptona-agua que contiene 1 P/V% de D-glucosa, D-mannosa, D-galactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, D-sorbitol, D-mannitol, inositol o glicerol. - - - - -
10. (18) Asimilación de fuentes de carbono: Los resultados de cultivo en medios de sales inorgánicas (bifosfato dipotásico 0,7 P/V%, dibifosfato monopotásico 0,3 P/V%, sulfato amónico 0,1 P/V%, cloruro sódico 0,1 P/V%, sulfato magnésico $\cdot 7H_2O$ 0,01 P/V%) que contenían varias fuentes de carbono, durante 14 días, se dan en la Tabla 1. - - - - -
- 15.

Tabla 1

Asimilación de fuentes de carbono

<u>Fuente de carbono</u>	<u>Concentración final (P/V%)</u>	<u>Crecimiento</u>
L-arabinosa	1	+
D-xilosa	1	+
D-glucosa	1	+
D-mannosa	1	+
D-fructosa	1	+
D-galactosa	1	+

Tabla 1 (continuación)

<u>Fuente de carbono</u>	<u>Concentración final (P/V%)</u>	<u>Crecimiento</u>
maltosa	1	+
sucrosa	1	+
lactosa	1	-
trehalosa	1	+
D-sorbitol	1	+
D-mannitol	1	+
inositol	1	+
glicerol	1	+
almidón	1	-
alfa-metil-D-glucósido	1	+
melibiosa	1	-
adonitol	1	+
dulcitol	1	-
rafinosa	1	+
<u>cis</u> -aconitato	0,3	+
citrato	0,3	+
isocitrato	0,3	+
gluconato	0,3	+
acetato	0,3	+
fumarato	0,3	+
malato	0,3	+
tartrato	0,3	+
p-hidroxibenzoato	0,3	+
L-alanina	0,3	+

Tabla 1 (continuación)

<u>Fuente de carbono</u>	<u>Concentración final (P/V%)</u>	<u>Crecimiento</u>
beta-alanina	0,3	+
L-isoleucina	0,3	+
succinato	0,3	+
L-valina	0,3	-
2-cetogluconato	0,3	+

Notas: + : Crecimiento; ± : escaso crecimiento; - : ningún crecimiento

(19) Otras propiedades - - - - -

- I) Utilización de malonato: negativa - - - - -
- 5. II) Desaminación de fenilalanina: negativa - - -
- III) Actividad descarboxilasa - - - - -
- a) Arginina: negativa - - - - -
- b) Lisina: negativa - - - - -
- c) Ornitina: negativa - - - - -
- 10. IV) Hidrólisis de succina: positiva - - - - -
- V) Hidrólisis de Tween 80: positiva - - - - -
- VI) Contenido de GC (guanina-citosina) de DNAs
59,5 moles % - - - - -

15. La comparación de las anteriores características bacteriológicas de la cepa G-6302 con la descripción del

Manual of Determinative Bacteriology de Bergey, Ed. 7 y 8, demuestra que, dado que se trata de una bacteria gramnegativa barriforme, estrictamente aeróbica, móvil con uno o varios flagelos polares y positiva a la catalasa, la cepa

5. G-6302 pertenece obviamente a la familia Pseudomonadaceae. El hecho de que no tenga requisitos nutricionales y de que tenga un contenido GC de 59,5 moles% sugiere que la cepa pertenece al género Pseudomonas. Como bacterias Pseudomonas que son relativamente similares a la cepa G-6302 con respecto a las anteriores características pueden mencionarse las Pseudomonas syringae y Pseudomonas maltophilia, que son negativas a la oxidasa citocromo. Sin embargo, la P. maltophilia difiere evidentemente de la cepa G-6302 en que la P. maltophilia demanda metionina y no da crecimiento a 4°C. Si bien la Pseudomonas syringae es una especie que incluye un gran número de subespecies, resulta evidente de la Tabla 2 que la incapacidad de utilizar ciertas fuentes de carbono, característica común de tales cepas, no se halla en la cepa G-6302. - - - - -
- 10.
- 15.

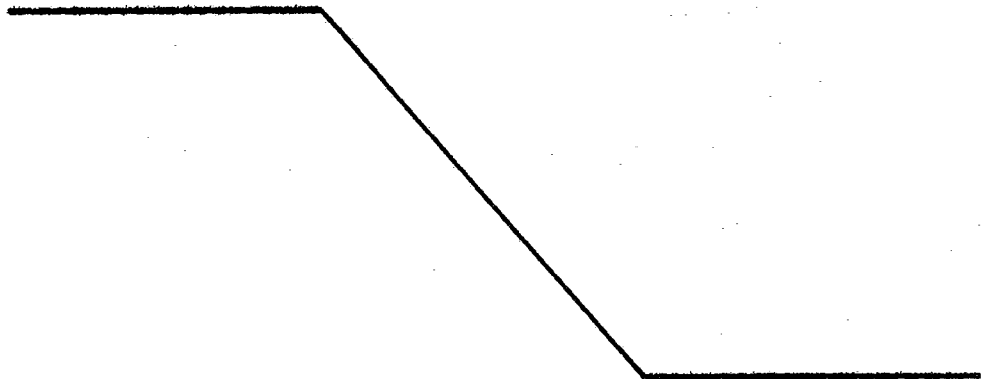


Tabla 2

Comparación de la asimilabilidad de varias fuentes de carbono

<u>Fuente de carbono</u>	<u>Pseudomonas syringae</u>	<u>Cepa G-6302</u>
Trehalosa	-	+
2-oxogluconato	-	+
beta-alanina	-	+
L-isoleucina	-	+

+ : asimilaron ; - : no asimilaron

Además, el pH óptimo para el crecimiento de la cepa G-6302 es muy bajo, a saber 4,5 a 6,0, teniendo lugar crecimiento incluso a pH 4,0. Estas diferencias eliminan la posibilidad de considerar la cepa G-6302 como una cepa de

5. Pseudomonas syringae. Por ello, se considera que la G-6302 pertenece a una nueva especie del género Pseudomonas. Y, dada la característica de su bajo pH óptimo de crecimiento de 4,5 a 6,0, que es bajo para bacterias que pertenecen en general al género Pseudomonas, la cepa G-6302 se denominó
10. Pseudomonas acidophila G-6302. - - - - -

Muestras de esta cepa G-6302 han sido depositadas respectivamente en el Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology (FERM), Chiba, Japón bajo el número de depósito FERM-P 4344, en el Institute for

Fermentation, Osaka (IFO), Japón, bajo el número de acceso IFO 13774 y en la American Type Culture Collection, (ATCC), Maryland, U.S.A., bajo el número de acceso ATCC-31363. - - -

5. Las bacterias Pseudomonas empleadas según esta invención son en general de características muy variables y sufre fácilmente mutación cuando se someten a tratamientos mutagénicos artificiales tales como irradiación con luz ultravioleta o rayos X o tratamiento con mutágenos químicos. Sin embargo, todos y cada uno de tales mutantes y variantes son
10. útiles para los fines de esta invención sólo si poseen y retienen la capacidad de elaborar G-6302, el antibiótico objetivo de esta invención. - - - - -

15. Para el cultivo de la cepa G-6302, pueden emplearse fuentes de carbono tales como glucosa, sucrosa, maltosa, melazas agotadas, glicerol, aceites y grasas (por ejemplo aceite de soja, aceite de oliva, etc.), ácidos orgánicos (por ejemplo ácido cítrico, ácido succínico, ácido glucónico, etc.) y otras fuentes de carbono asimilable. Como fuentes de nitrógeno pueden emplearse compuestos y materiales
20. orgánicos e inorgánicos que contengan nitrógeno tales como, por ejemplo, harina de soja, harina de semilla de algodón, líquidos del remojado del maíz, levadura seca, extracto de levadura, extracto de carne, peptona, urea, sulfato amónico, nitrato amónico, cloruro amónico, fosfato amónico, etc. Ad-
25. más, las sales inorgánicas requeridas normalmente para el cul

tivo de bacterias, tales como cloruro sódico, cloruro potásico, carbonato cálcico, sulfato magnésico, bifosfato monopotásico, fosfato disódico, etc., pueden emplearse ya sea solas o en combinación adecuada. Se ha hallado que el rendimiento del antibiótico deseado puede aumentarse suplementando tal medio con un compuesto de azufre que es capaz de utilizar el productor de G-6302, a saber compuestos inorgánicos de azufre tales como sulfatos (por ejemplo sulfato sódico), tiosulfatos (por ejemplo tiosulfato sódico), etc., o compuestos orgánicos de azufre tales como aminoácidos que contienen azufre (por ejemplo cistina, cisteína, metionina), etc. Para este fin es particularmente preferido el tiosulfato sódico. La concentración de tales compuestos de azufre en el medio de cultivo es de 0,01 a 1,0 P/V por ciento y, preferentemente, de 0,02 a 0,5 P/V por ciento. La adición de tal compuesto de azufre al medio origina una mayor producción de G-6302, siendo por ello, comercialmente, de considerable valor. - - - -

Además, pueden incorporarse, según se requiera, sales de metales pesados tales como sulfato ferroso, sulfato de cobre, etc., vitaminas tales como vitamina B₁, biotin, etc. y otros aditivos. También pueden añadirse antiespumas y surfactantes tales como aceite de siliconas, éter de polialquilenglicol, etc. Desde luego, pueden también añadirse, en cantidades adecuadas, otras materias orgánicas o inorgánicas que puedan ayudar al crecimiento del microorganismo y fomentar la producción de G-6302. - - - - -

El cultivo de la cepa G-6302 puede realizarse por procesos similares a los utilizados para la producción de antibióticos en general, empleando un método de cultivo en sólido o un método de cultivo en líquido. En el caso del cultivo en líquido éste puede ser estacionario, con agitación, con sacudidas o aeróbico, aunque es particularmente deseable el cultivo aeróbico con agitación. La temperatura preferida de cultivo oscila entre unos 15 y 35°C, mientras que el pH del medio de cultivo puede oscilar entre unos 4 y 8. El cultivo se prosigue durante unas 8 a 168 horas, preferentemente durante 24 a 144 horas. Dado que el antibiótico G-6302 producido se halla en su mayor parte presente en la fase líquida del caldo de fermentación, es ventajoso centrifugar o filtrar el caldo para separar el fluido sobrenadante o el filtrado de una masa celular y purificar el G-6302 en el fluido sobrenadante o filtrado. Sin embargo, puede también realizarse, si se desea, la purificación directa a partir del caldo de fermentación. - - - - -

5.

10.

15.

20.

El ensayo de la potencia del producto así obtenido puede realizarse contra Proteus mirabilis IFO 3849 como organismo de ensayo y utilizando G-6302 como estándar por medio del método del cilindro o del método del disco de papel que emplea TSA (agar de soja tripticasa (Baltimore Biologicals, Limited, U.S.A.)). - - - - -

25.

El Antibiótico G-6302 puede recuperarse por medio

- de varios procesos empleados comúnmente para la recuperación de metabolitos microbianos. Así, por ejemplo, las células se eliminan por centrifugación y el producto activo se separa del fluido sobrenadante y se purifica por medio de los métodos convencionales. Por ejemplo, pueden utilizarse el proceso que utiliza la solubilidad o la diferencia de solubilidades con respecto a un disolvente adecuado, el proceso que utiliza la precipitación o la diferencia del régimen de precipitación del antibiótico a partir de una disolución, el proceso que utiliza su afinidad característica adsorbtiva para varios adsorbentes, cromatografía de intercambio iónico en intercambiadores iónicos, concentración bajo presión reducida, secado por congelación, cristalización, recristalización, secado, etc., ya sean solos o en una combinación y secuencia y/o repetición adecuadas. - - - - -
- 5.
- 10.
- 15.

- Se describirá a continuación un proceso típico. Después de acabado el cultivo, se filtra el caldo de fermentación, el filtrado resultante se hace pasar a través de una columna de carbón activado y el G-6302 adsorbido se eluye con un disolvente orgánico hidrófilo. Como ejemplos del disolvente orgánico hidrófilo pueden mencionarse las cetonas inferiores (por ejemplo acetona, metiletilcetona, metilisobutilcetona, etc.) y los alcoholes inferiores (por ejemplo metanol, etanol, isopropanol, propanol, butanol, etc.). Estos disolventes pueden utilizarse solos o como una mezcla en combinación con agua. Debido a la naturaleza ácida del G-6302,
- 20.
- 25.

- pueden emplearse ventajosamente resinas de intercambio de aniones, tales como resinas de la forma Cl (Amberlite IRA-400 & 402, fabricada por Amberlite Co., U.S.A.; Dowex-1, Dow and Chemical Co., U.S.A.; Diaion SA-21A, Mitsubishi Chemical Industries, Japón). El producto activo adsorbido se eluye, por ejemplo con una disolución acuosa de cloruro sódico. Para desalar el eluato, se realiza de nuevo una cromatografía en columna con carbón activo. El eluato obtenido se concentra entonces y se añade, por ejemplo, acetona y el precipitado resultante se recupera por filtración, se lava con acetona y con éter de dietilo y se seca bajo presión reducida para recuperar polvos de color pardo claro. Para purificar el G-6302 de los polvos, puede emplearse ventajosamente cromatografía en columna en DEAE-Sephadex (Farmacia, Suecia). Así, se lava una columna de DEAE-Sephadex A-25 con tampón fosfato M/100 (pH 6,6) y se hace pasar una disolución acuosa de los anteriores polvos a través de la columna y el antibiótico es adsorbido en la misma. La columna se lava con la misma disolución tampón que anteriormente y se realiza elución con el tampón que contiene 0,5 P/V% de cloruro sódico. Las fracciones activas se combinan, se ajusta a pH 3,0 y se hace pasar de nuevo a través de la columna de carbón activo. La columna se lava con agua y con 20 V/V% de metanol acuoso, sucesivamente. Entonces se realiza elución con acetona acuosa y las fracciones activas se combinan y se concentran bajo presión reducida. Se añade acetona al concentrado, por lo que se obtiene G-6302. El G-6302 forma sales metálicas y sal
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.

ácida. Como sales metálicas pueden mencionarse la sal sódica, la sal potásica, la sal lítica, etc. - - - - -

Las propiedades fisicoquímicas del G-6302 obtenido en el Ejemplo 1 que sigue a continuación, son como se indica ahora. - - - - -

5.

1. Punto de fusión: 120°C (sinterización), 130°C (descomp.)

2. Aspecto: polvo blanco - - - - -

3. Análisis elemental (después de secar bajo presión reducida sobre pentóxido de fósforo a 40°C durante 6 horas) (%) - - - - -

10.

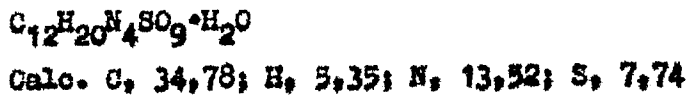
C	34,83	35,45 (34,99 ± 0,5)
H	5,41	5,24 (5,58 ± 0,5)
N	13,22	13,73 (13,60 ± 0,5)
S	7,65	7,75 (7,70 ± 0,5)
O		(38,13 ± 0,5)

15.

4. Peso molecular - - - - -

Titulometría : 400 ± 20 - - - - -

Fórmula empírica (basada en los anteriores datos) - - -



20.

5. Espectro de absorción de ultravioletas - - - - -

Sólo absorciones extremas (sin absorciones característi-
cas en 210 nm) - - - - -

6. Espectro de absorción de infrarrojos (Fig. 1), puntas do-
minantes (KBr) (cm^{-1}): - - - - -
5. 3440(s), 2920(m), 2850(m), 2600(w), 1770(s), 1650(s),
1530(s), 1458(m), 1390(w), 1340(w), 1280(sh), 1240(s),
1210(sh), 1180(m), 1118(w), 1043(s), 792(w), 632(s)
(s, m y w significan absorciones fuertes, medias y débi-
les, respectivamente; sh significa resalte) - - - - -
10. 7. Rotación específica: $[\alpha]_D^{23} +94 \pm 10^2 (c=0,35, \text{H}_2\text{O})$ - - -
8. Espectro de resonancia magnética nuclear (en sulfóxido
de dimetilo, 100 MHz) delta 3,31 ppm (s, un desplazamien-
to químico atribuible a $\text{O}-\text{OH}_2$) - - - - -
9. Solubilidad en disolventes: - - - - -
15. Insoluble en éter de petróleo, hexano, éter de dietilo,
benceno, acetato de etilo y cloroformo; escasamente so-
luble en etanol, piridina y acetona; soluble en metanol
y sulfóxido de dimetilo; fácilmente soluble en agua. - -
10. Reacciones de color: - - - - -
20. Positivas: reacciones con ninhidrina y permanganato potá-
sico; negativas: reacciones con cloruro férrico-ferrocia-

nuro potásico, Sakaguchi y Molisch; dudosamente positivas: reacción de Ehrlich. - - - - -

11. Estabilidad: - - - - -

5. Estable en disolución acuosa en la gama de pH 3-pH 7 a 60°C durante 10 minutos; inestable por encima de pH 8,5.

12. Basicidad, neutralidad o acidez: ácido. - - - - -

Las propiedades fisicoquímicas de la sal sódica del G-6302 obtenido en el Ejemplo 3, que se da luego, son como sigue. - - - - -

10. 1. Punto de fusión: sin punto de fusión definido (se vuelve pardo a 170°C) - - - - -

2. Aspecto: polvo blanco - - - - -

15. 3. Análisis elemental (después de secar bajo presión reducida y sobre pentóxido de fósforo a 40°C durante 6 horas) (%): - - - - -

	C	33,08	33,32
	H	5,07	4,97
	N	12,73	13,27
	S	7,33	7,43
20.	Na	5,19	5,31

4. Peso molecular: 438 ± 5 , suponiendo que 1 mol de Na es-

tá contenido en cada molécula. - - - - -

Fórmula empírica (basada en los anteriores datos)



Calc. C, 33,03; H, 4,65; N, 12,84; S, 7,35; Na, 5,27

- 5. 5. Espectro de absorción de ultravioletas: sólo absorciones extremas. - - - - -
- 6. Espectro de absorción de infrarrojos (Fig. 2), puntas dominantes (KBr) (cm⁻¹): - - - - -
 3430(s), 3250(sh), 3000(m), 1770(s), 1640(s), 1530(s),
 1450(w), 1405(w), 1343(w), 1280(sh), 1245(s), 1180(w),
 1118(w), 1050(s), 820(w), 785(w), 632(s)
 (s, m y w significan absorciones fuertes, medias y débiles, respectivamente; sh significa resalte) - - - - -
- 7. Rotación específica: $[\alpha]_D^{23} + 85^\circ \pm 10^\circ (c=0,37, H_2O)$ - - -
- 15. 8. Solubilidad en disolventes: - - - - -
 Insoluble en éter de petróleo, hexano, éter de dietilo, benceno, acetato de etilo, cloroformo y acetona; escasamente soluble en metanol, etanol y piridina; soluble en sulfóxido de dimetilo; fácilmente soluble en agua. - - -
- 20. 9. Reacciones de color: - - - - -
 Positivas: reacciones con ninhidrina y permanganato potásico

sico; negativas reacciones con cloruro férrico-ferricitruo potásico y de Sakaguchi y Molisch; fuertemente positivas reacción de Ehrlich - - - - -

10. Estabilidad - - - - -

5. Estable en disolución acuosa en la gama de pH 3-pH 7 a 60°C durante 10 minutos de calentamiento; inestable por encima de pH 8,5. - - - - -

10. Para convertir la forma de ácido libre de G-6302 en una sal, puede obtenerse por ejemplo la sal sódica por adición de un equivalente molar de hidróxido sódico a una disolución acuosa del ácido libre y secando entonces por coagulación al sistema. - - - - -

15. Para convertir una sal de G-6302 en la forma de ácido libre, este último puede obtenerse, por ejemplo, por adición de ácido clorhídrico 1N a una disolución acuosa de la sal sódica, por ejemplo, de G-6302 para llevar la disolución a pH 3,0 y desalando la disolución por medio de carbón activado. - - - - -

20. Las características biológicas del G-6302 son como sigue. Los espectros antimicrobianos del G-6302 y su sal sódica contra varios microorganismos se ilustran en la Tabla 3 (método de dilución de placa de agar). - - - - -

De esta tabla resultará evidente que el Antibióti-

co G-6302 es principalmente activo contra bacterias gramnegativas pero también es activo contra algunas bacterias grampositivas. - - - - -

5. La toxicidad aguda de la sal sódica del Antibiótico G-6302 es baja, no hallándose muertes cuando se administraron 500 mg/kg de la sal a ratones por vía intravenosa. -

10. El G-6302 demostró también tener una acción protectora en los ratones infectados con Escherichia coli o Klebsiella pneumoniae a la dosis subcutánea de 10 mg/kg o a la dosis oral de 100 mg/kg. - - - - -

Tabla 3

Espectros antimicrobianos del G-6302 y de su sal sódica

Organismo de ensayo	Concentración inhibidora mínima (mcg/ml)	
	G-6302	G-6302·Na
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	25	25
<i>Escherichia coli</i> T-7	25	25
<i>Salmonella typhosa</i> Boxhill 58	12,5	12,5
<i>Shigella flexneri</i> EW-10	25	25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> DT	12,5	12,5
<i>Proteus vulgaris</i> IFO 3988	100	100
<i>Proteus morgani</i> IFO 3168	100	100
<i>Proteus mirabilis</i> IFO 3849	25	25
<i>Serratia marcescens</i> IFO 12648	100	100

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> U-31	>100	>100
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	>100	>100
<i>Streptococcus pyogenes</i> E-14	>100	>100
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	100	100
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> Toronto	12,5	12,5
<i>Candida albicans</i> IFO 0583	>100 ^M	>100 ^M
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 0209	>100 ^M	>100 ^M
<i>Aspergillus niger</i> IFO 4066	>100 ^M	>100 ^M
<i>Penicillium chrysogenum</i> IFO 4626	>100 ^M	>100 ^M

Notas: Medio = Tripticasa-soja-caldo-agar

^M Medio = Agar nutriente que contiene 1% de glicosa

- Como se verá del anterior espectro antimicrobiano
5. el G-6302 preparado según esta invención es inhibidor respecto a las bacterias gramnegativas y grampositivas. Por ello puede utilizarse en el tratamiento de infecciones con las mencionadas bacterias en mamíferos (por ejemplo ratón, rata, perro y hombre) y especies de aves domesticadas (por ejemplo gallinas y patos).
10. Para utilizar G-6302 como medicina de infecciones por Escherichia coli, se disuelve en disolución salina fisiológica, por ejemplo, y se administra parenteralmente, por ejemplo subcutánea o intramuscularmente, a la dosis de 5 a 30 mg/kg de peso corporal, diariamente. Para el
15. uso oral, el Antibiótico G-6302 se mezcla con lactosa, por ejemplo, se encapsula y se administra a la dosis de 20 a 200 mg (como G-6302)/kg de peso corporal, diariamente. - - -

El G-6302 puede utilizarse también como germicida o desinfectante. Por ejemplo, el G-6302 se disuelve en agua destilada para preparar una disolución que contiene de 0,1 a 1,0 P/V por ciento de G-6302 o se formula con una base de unguento tal como vaselina o lanolina para preparar un unguento que contenga de 5 a 20 mg de G-6302 por gramo y dicha disolución o unguento se aplica a las garras, patas, ojos, orejas y otras partes de los mencionados animales, como desinfectante. - - - - -

5.

El G-6302 es un compuesto muy prometedor puesto que es útil como intermedio para la síntesis de nuevas sustancias médicas. - - - - -

10.

La comparación del Antibiótico G-6302 con los antibióticos conocidos ha demostrado lo siguiente: En primer lugar, como antibióticos que son solubles en agua y ácidos y que contienen azufre pueden mencionarse las penicilinas y las cefalosporinas. Sin embargo, dado que el G-6302 no absorbe en la zona ultravioleta del espectro, esto lo diferencia de las cefalosporinas. Además, el hecho de que el espectro de resonancia magnética nuclear dé un desplazamiento químico atribuible a protones α -metílicos y el hecho de que dé lugar a ácido glutámico con hidrólisis ácida son las pruebas de que el G-6302 difiere de cualquiera de las penicilinas y cefalosporinas que se dan en la naturaleza. - - - - -

15.

20.

25.

Por otra parte, existen muchos antibióticos conoci

- dos elaborados por bacterias del género Pseudomonas pero ninguno de ellos es un antibiótico soluble en agua que sea ácido y contenga azufre. Además, el G-6302 difiere de cualquiera de los antibióticos conocidos producidos por microorganismos distintos de las cepas de Pseudomonas debido a sus peculiares propiedades fisicoquímicas y biológicas. Por ello, el G-6302 se considera un compuesto nuevo. - - - - -
- 5.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente esta invención. - - - - -

10. En los ejemplos, "parte(s)" se basa en peso a menos que se indique de otra forma y la relación entre "parte(s)" y "parte(s) en volumen" corresponde a la existente entre "gramo(s)" y "mililitro(s)" y "%" se basa en "peso/volumen" a menos que se indique de otra forma. - - - - -

15. Ejemplo 1

- Las células de Pseudomonas acidophila G-6302 (FERM-P N° 4344; IFO 13774; ATCC-31363) que crecen en un slant de agar nutriente se utilizaron para inocular dos frascos Sakaguchi de 2×10^3 partes en volumen que contenían cada uno 500 partes en volumen de un medio compuesto por 1% de glucosa, 0,5% de Polypepton (preparado por Daigo Nutritive Chemicals Co. Japón), 0,5% de extracto de carne y 0,5% de oliguro médico (pH 7,0), y cada frasco se incubó en un sacudidor alternativo a 28°C durante 48 horas. El cultivo resultan
- 20.

te se utilizó como cultivo de siembra. - - - - -

5. Un fermentador de depósito de acero inoxidable de 200×10^3 partes en volumen se llenó con 120×10^3 partes en volumen de un medio compuesto por 3% de glicerol, 0,1% de glucosa, 0,5% de Polypepton, 0,5% de extracto de carne y 0,5% de NaCl y, después de ajuste a pH 7,0 con hidróxido sódico acuoso al 30%, se esterilizó con vapor de agua a 120°C durante 20 minutos. El depósito esterilizado se inoculó entonces con el anterior cultivo de siembra y se incubó a una temperatura de 28°C con aireación al régimen de 120×10^3 partes en volumen/min y a una agitación de 180 r.p.m. durante 78 horas. El caldo resultante se centrifugó con un separador centrifugo Sharples para eliminar las células, que dejaron 110×10^3 partes en volumen de fluido sobrenadante. El fluido se ajustó a pH 4,2 y se hizo pasar a través de una columna de 15×10^3 partes en volumen de carbón activado (grado cromatográfico SHIRASAGI, fabricado por Takeda Chemical Industries, Ltd., Japón) para adsorber la sustancia activa en aquélla. La columna se enjuagó con 45×10^3 partes en volumen de agua y luego se realizó una elución con 45×10^3 partes en volumen de acetona acuosa al 50 V/V%, recogiénose el eluato en fracciones de 10×10^3 partes en volumen. Las fracciones se ensayaron contra Proteus mirabilis IPO 3849. Las fracciones 2 y 3 se combinaron, se añadieron 20×10^3 partes en volumen de agua y la mezcla se hizo pasar a través de una columna rellena con 10×10^3 partes en volumen de Dowex-1 (forma Cl)
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.

- (Dow and Chemical Industries, U.S.A.). La columna se enjuagó con 25×10^3 partes en volumen de agua y se realizó elución con 50×10^3 partes en volumen de una disolución acuosa de cloruro sódico al 5%. Las fracciones activas se combinaron,
5. se ajustó el pH a 4,0 y se hicieron pasar de nuevo a través de una columna de carbón activado (8×10^3 partes en volumen). La columna se lavó con 24×10^3 partes en volumen de agua y se realizó elución con metanol acuoso al 20 V/V%. Las fracciones activas se combinaron y se concentraron a 50 partes
10. en volumen bajo presión reducida. Entonces se añadieron 200 partes en volumen de acetona y el precipitado resultante se recuperó por filtración, se lavó con 50 partes en volumen de acetona y 100 partes en volumen de éter de diétilo, a lo que siguió secado bajo presión reducida. Por medio del anterior
15. proceso se obtuvieron 12 partes de producto bruto. - - - - -

- En 500 partes en volumen de tampón fosfato M/100 (pH 6,6) se disolvieron 10 partes del anterior producto bruto y la disolución se hizo pasar a través de una columna de 200 partes en volumen de DEAE-Sephadex A-25 (Farmacia, Suecia)
20. previamente tamponado con la misma disolución tampón que se ha mencionado. La columna se lavó con 400 partes en volumen de la misma disolución tampón y luego se realizó elución con el mismo tampón al que se había añadido 0,5% de cloruro sódico. Las fracciones activas se combinaron, se ajustaron a pH 3,2 con HCl 1N y se hicieron pasar a través de una
25. columna de 600 partes en volumen de carbón activado. La co-

- luma se lavó con 200 partes en volumen de agua y 100 partes en volumen de metanol acuoso al 20 V/V%, a lo que siguió elución con acetona acuosa al 50 V/V%. Las fracciones activas se combinaron, se concentraron bajo presión reducida y se disolvieron en 5 partes en volumen de metanol. Después de la adición de 100 partes en volumen de acetona, la disolución se dejó reposar en frío. El precipitado resultante se recuperó por filtración, se lavó con éter de dietilo y se secó bajo presión reducida y sobre pentóxido de fósforo a 40°C durante 6 horas. Por medio del anterior proceso se obtuvieron 3,8 partes de polvo. El espectro de absorción de infrarrojos de este producto se ilustra en la Fig. 1. - - - - -
- 5.
- 10.
- Análisis elemental: C 34,83; H 5,41; N, 13,22; S, 7,65 (P/P%)

Ejemplo 2

- Un fermentador de depósito de acero inoxidable de 50 x 10³ partes en volumen se llenó con 35 x 10³ partes en volumen de un medio compuesto por 3% de glicerol, 0,1% de glucosa, 0,5% de Polypepton, 0,5% de extracto de carne y 0,5% de cloruro sódico y, después de ajustar el pH del medio a 7,0 con hidróxido sódico acuoso al 30%, se esterilizó con vapor de agua a 120°C durante 20 minutos. El depósito esterilizado se inoculó con la misma cepa de microorganismo que la utilizada en el Ejemplo 1 y se incubó a 28°C con aireación al régimen de 35 x 10³ partes por volumen/min y con una agitación de 180 r.p.m. durante 48 horas para preparar un culti
- 15.
- 20.

vo secundario de siembra. - - - - -

5. Un fermentador de depósito de acero inoxidable de 2000×10^3 partes en volumen se llenó con 1200×10^3 partes en volumen de un medio compuesto por 3% de glicerol, 0,1% de glucosa, 0,5% de Polypepton, 0,5% de extracto de carne, 0,5% de cloruro sódico y 0,1% de tiosulfato sódico y, después de ajuste a pH 7,0 con una disolución al 30% de hidróxido sódico, se esterilizó con vapor de agua a 120°C durante 20 minutos. El depósito esterilizado se inoculó con el anterior cultivo secundario de siembra. - - - - -

10. El medio inoculado del depósito se incubó a 28°C con aireación al régimen de 1200×10^3 partes en volumen/min y con una agitación de 180 r.p.m. durante 90 horas, con lo que se obtuvieron 1150×10^3 partes en volumen de caldo. A este caldo se le añadieron 40×10^3 partes de Hyflo-Supr-Cel (Johns-Manville, U.S.A.) y se filtró con un filtro prensa. El filtrado se ajustó a pH 4,2 con ácido sulfúrico 4N y se hizo pasar en columna sobre 120×10^3 partes en volumen de carbón activado. La columna se lavó con 300×10^3 partes en volumen de agua y se realizó elución con acetona acuosa al 50 V/V%. Las fracciones activas se combinaron y se concentraron bajo presión reducida para eliminar la acetona. El concentrado acuoso así obtenido se diluyó con agua a 200×10^3 partes en volumen y se hizo pasar a través de una columna de 50×10^3 partes en volumen de Diaion SA-21A (forma Cl) (fabricado por Mitsubishi Chemical Industries, Japón). La columna se enjuaga

- gó con 150×10^3 partes en volumen de agua y se realizó elución con cloruro sódico acuoso al 1%. Las fracciones activas se combinaron y se concentraron bajo presión reducida a 100 partes en volumen y entonces se añadieron 2×10^3 partes en volumen de metanol y el cloruro sódico precipitado se separó por filtración. El filtrado se concentró adicionalmente bajo presión reducida a 200 partes en volumen y entonces se añadieron 2×10^3 partes en volumen de acetona y el precipitado se recuperó por filtración y se secó. Por medio del anterior
5. proceso se obtuvieron 757 partes de producto bruto. Este producto bruto (500 partes) se disolvió en 5×10^3 partes en volumen de agua, se ajustó a pH 4,0 y se adsorbió en una columna de carbón activado (5×10^3 partes en volumen). El ingrediente activo se eluyó por medio del método de la elución
10. gradiente utilizando 10×10^3 partes en volumen de agua a través de 10×10^3 partes en volumen de metanol acuoso al 70 V/V% y el eluato se recogió en fracciones de 1×10^3 partes en volumen. Las fracciones activas se combinaron, se concentraron bajo presión reducida para eliminar el metanol y
15. se complementaron hasta 6×10^3 partes en volumen con tampón fosfato M/100 (pH 6,0). Esta disolución de muestra fue adsorbida en una columna de 3×10^3 partes en volumen de DEAE-Sephadex A-25 que se había preparado como se ha descrito en el Ejemplo 1 y, después de lavar la columna con 6×10^3 partes en volumen del mismo tampón, se realizó elución con el
20. mismo tampón suplementado con 0,5% de cloruro sódico, recogiendo el eluato en fracciones de 500 partes en volumen.
- 25.

- Las fracciones activas se combinaron, se ajustaron a pH 3 con HCl 1N y se hicieron pasar a través de una columna de $0,5 \times 10^3$ partes en volumen de carbón activado. La columna se lavó con 2×10^3 partes en volumen de agua a través de
5. 2×10^3 partes en volumen de metanol acuoso al 20 V/V% y luego se realizó elución con acetona acuosa al 50 V/V%, reco- giéndose el eluato en fracciones de 200 partes en volumen. Las fracciones activas se combinaron, se concentraron bajo presión reducida y se disolvieron por adición de 300 partes
10. en volumen de metanol. Después de la adición de 3×10^3 partes en volumen de acetona y de 4×10^3 partes en volumen de éter de dietilo, la disolución se dejó reposar en frío y el G-6302 precipitado se recuperó por filtración, se lavó con éter de dietilo y se secó bajo presión reducida y sobre pen- tóxido de fósforo. Rendimiento 72 partes. - - - - -
15. Análisis elemental: C 35,45; H 5,24; N 13,73; S 7,75 (P/P%)

Ejemplo 3

- En 90 partes en volumen de agua se disolvieron 4,0 partes de la forma libre del G-6302 obtenido en los Ejemplos
20. 1 y 2 y, bajo enfriamiento, se añadieron aproximadamente 9,0 partes en volumen de hidróxido sódico acuoso 1N. Esta adic- ión fue seguida por la adición de otra cantidad de hidróxi- do sódico 1N vigilándose el pH de la disolución hasta que se estableció un pH de 6,5. La disolución se secó por congela- ción, con lo que se obtuvieron 4,2 partes de sal monosódica
25. de G-6302 como polvos blancos. El espectro de absorción de

infrarrojos de este producto después del secado bajo presión reducida y a 40°C durante 6 horas se ilustra en la Fig. 2. -

Análisis elemental: C 33,08; H 5,07; N 12,73; S 7,33;

Na 5,19 (P/P%)

5.

Ejemplo 4

Las células de Pseudomonas acidophila G-6302

(FERM-P No. 4344; IFO 13774; ATCC-31363) crecidas en un slant de agar nutriente se utilizaron para inocular un matraz cónico de 200 partes en volumen que contenía 40 partes en volumen de un medio compuesto por 1% de glucosa, 0,5% de Polypepton, 0,5% de extracto de carne y 0,5% de cloruro sódico (pH 7,0) y el matraz inoculado se incubó en un sacudidor rotativo a 28°C durante 48 horas para preparar un cultivo de siembra. - - - - -

10.

15.

Entonces se llenaron matraces cónicos de 200 partes en volumen con 40 partes en volumen de un medio compuesto por 3% de glicerol, 1% de glucosa, 0,5% de Polypepton (Daigo Nutritive Chemicals), 0,5% de extracto de carne y 0,5% de cloruro sódico (pH 7,0) y se añadieron a los matraces de 0,02 a 0,5% de varios compuestos de azufre. Entonces

20.

cada matraz fue inoculado con 1 parte en volumen del anterior cultivo de siembra e incubado en un agitador rotativo a 28°C durante 96 horas. Como resultará evidente de la siguiente tabla, la producción de G-6302 aumentó notoriamente por medio de la adición de compuestos de azufre. - - - - -

25.

Compuesto de azufre	Concentración (%)	Producción (ug/ml)
No añadido	-	15
Metionina	0,02	20
	0,5	43
Cisteína	0,02	55
	0,1	65
Cistina	0,02	30
	0,5	65
Sulfato sódico	0,02	70
	0,1	48
Tiosulfato sódico	0,02	55
	0,1	60

Ejemplo 5

5. En 7,5 partes en volumen de agua fría se disolvió 1 parte de la forma libre del G-6302 obtenido en los Ejemplos 1 o 2 y a la mezcla se le añadieron 17,5 partes en volumen de metanol frío. - - - - -

10. La mezcla así obtenida se mantuvo en reposo en frío durante 24 horas para obtener polvos de G-6302 cristalizado en forma de cristales incoloros. Los cristales se recuperaron, se lavaron con una pequeña cantidad de metanol acuos frío al 80 V/V%, metanol frío y éter, sucesivamente, y se secaron sobre pentóxido de fósforo bajo presión reducida a 60°C durante 6 horas, con lo que se obtuvo 0,930 parte de cristales de G-6302. Las propiedades fisicoquímicas de los cristales así obtenidos son como sigue: - - - - -

1. Punto de fusión : 168 a 170°C -----

2. Análisis elemental : (P/P%) -----

Hallado

	C	35,51	35,56
5.	H	5,61	5,61
	N	12,93	12,98
	S	7,45	7,59

Calculado como $C_{12}H_{20}N_4SO_9 \cdot CH_3OH \cdot H_2O$

	C	36,69
10.	H	5,76
	N	12,81
	S	7,33

3. Rotación específica: $[\alpha]_D^{23} +82^{\circ} \pm 5^{\circ}$ (c=1,0, en H_2O) --

4. Espectro de absorción de infrarrojos (Fig. 3), puntas do
15. minantes (KBr) (cm^{-1}): -----

3440, 3355, 3000, 1780, 1660, 1650, 1538, 1265, 1245,
1220, 1038, 625

5. Espectro de resonancia magnética nuclear (en sulfóxido
de dimetilo, 100 MHz): -----

20. delta 3,31 ppm (s, 3H) (un desplazamiento químico atribui
ble al O-CH₃ de G-6302)

delta 3,20 ppm (s, 3H) (un desplazamiento químico atribui
ble al O-CH₃ de metanol que está contenido en los
cristales). -----

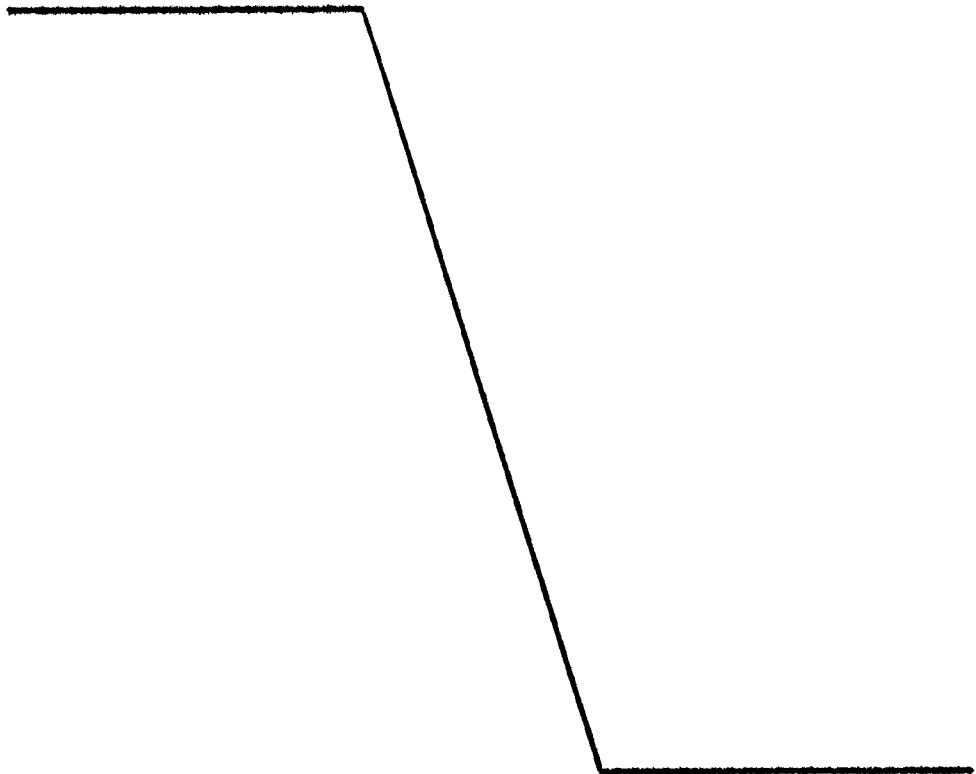
Otras propiedades fisicoquímicas, es decir espectro de absorción de ultravioletas, solubilidad en disolventes, reacciones de color, estabilidad y basicidad, neutralidad o acidez, son iguales que las del producto obtenido en el Ejemplo 1. - - - - -

5.

Se señala que en las Figuras, las ordenadas representan Transmitancia (%) y las abscisas representan Número de onda (cm^{-1}). - - - - -

10.

A los efectos consiguientes se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las reivindicaciones que siguen. - - - - -



REIVINDICACIONES

1.- Método de producir un antibiótico, caracteriza
 do por cultivar un microorganismo que pertenece al género
Pseudomonas y que es capaz de producir dicho antibiótico en
 un medio de cultivo para tener dicho antibiótico elaborado y
 acumulado en el caldo cultivado, y recuperar dicho antibióti
 co, actuándose bajo condiciones tales que el antibiótico pro
 ducido tenga las siguientes características: - - - - -

- (1) Punto de fusión: 120°C (sinterización), 130°C (descomp.)
10. (2) Aspecto: polvo blanco - - - - -
- (3) Análisis elemental (%): - - - - -

	C	34,99	± 0,5
	H	5,58	± 0,5
	N	13,30	± 0,5
15.	O	38,13	± 0,5
	S	7,70	± 0,5

(secado a 40°C durante 6 horas sobre pentóxido de fósfo
 ro bajo presión reducida), - - - - -

- (4) Espectro de absorción de ultravioleta: - - - - -
20. sin absorciones características en 210 nm, - - - - -

(5) Espectro de absorción de infrarrojos KBr , absorciones

dominantes (números de onda, cm^{-1}): - - - - -

1770, 1650, 1530, 1240, 1043, - - - - -

- (6) Rotación específica: $[\alpha]_D^{23} +949 \pm 10^3 (c=0,35, \text{H}_2\text{O})$ - -
5. (7) Solubilidad: insoluble en éter de petróleo, hexano, éter de dietilo, benceno, acetato de etilo y cloroformo; escasamente soluble en etanol, piridina y acetona; soluble en metanol y sulfóxido de dimetilo; y fácilmente soluble en agua, - - - - -
- (8) Basicidad, neutralidad o acidez: Acido, - - - - -
10. (9) Peso molecular: 400 ± 20 (por titulometría), - - - - -
- (10) Reacciones de color: Positivas: reacciones con anhidrina y permanganato potásico; negativas: reacciones con cloruro férrico-ferricianato potásico y de Sakaguchi y Molisch; débilmente positivas: reacción de Ehrlich. - -
15. 2.- Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el microorganismo es Pseudomonas acidophila. - - -
- 3.- Método según la reivindicación 2, caracterizado porque el microorganismo es Pseudomonas acidophila G-6302 (ATCC-31363; IFO 13774; FERM-P No. 4344). - - - - -
20. 4.- Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el medio de cultivo se suplementa con un compuesto

de azufre que es asimilado por el microorganismo que pertenece al género Pseudomonas y que es capaz de producir dicho antibiótico. - - - - -

5. 5.- Método según la reivindicación 4, caracterizado porque el compuesto de azufre es tiosulfato sódico, sulfato sódico, cistina, cisteína o metionina. - - - - -

6.- "MÉTODO DE PRODUCIR UN ANTIBIÓTICO". - - - - -

10. Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de treinta y siete hojas, foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras, y de tres láminas de dibujos que la ilustran.

MARTE 29 DIC. 1978

P. A. M. CUMEL SUÑOL

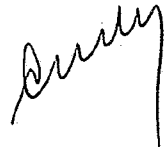
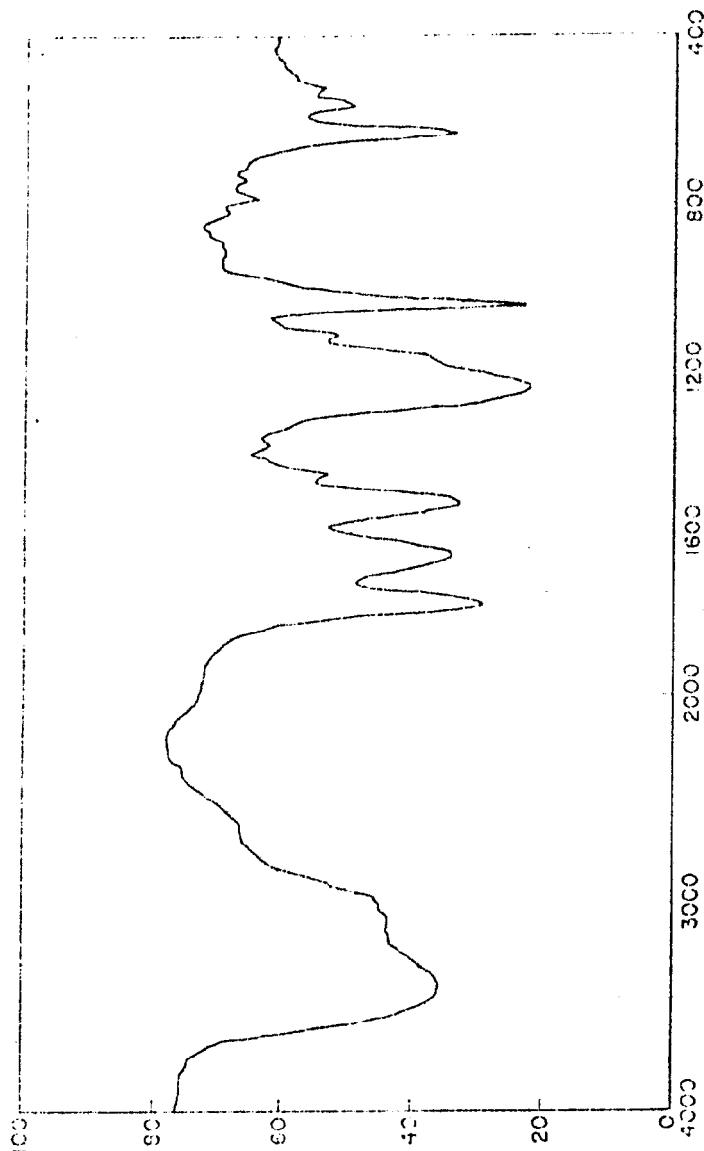


Fig. 1

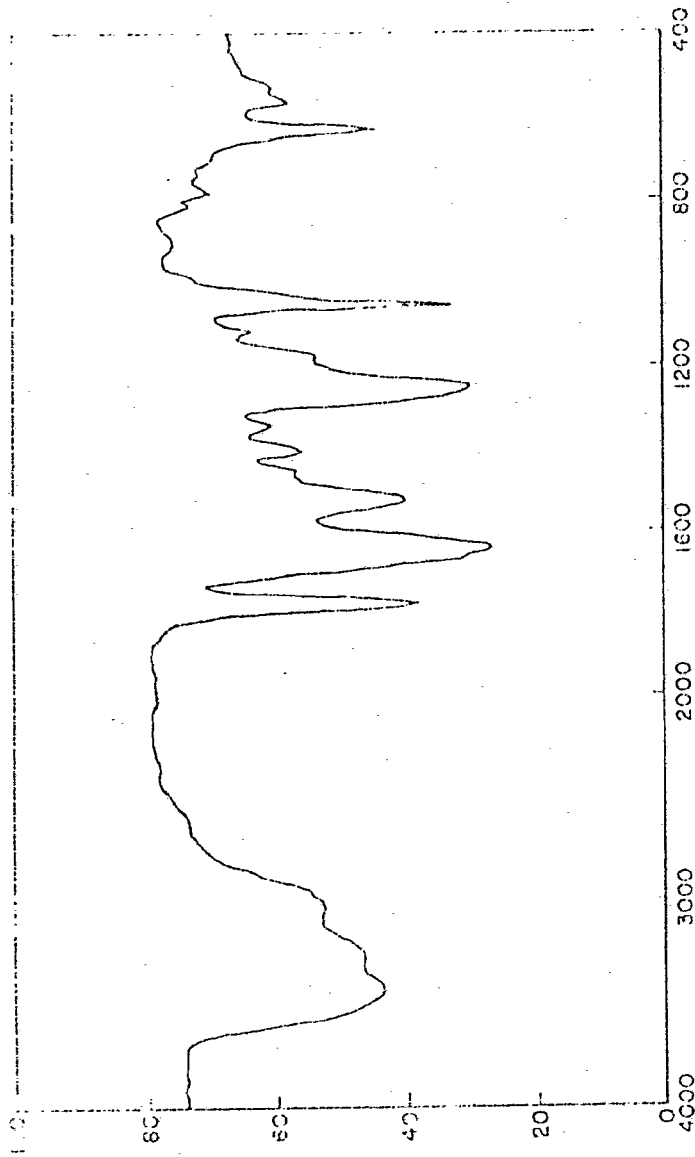


MADRID 29 DIC. 1978

P. A. M. CURELL SUÑOL

POOR
QUALITY

Fig. 2



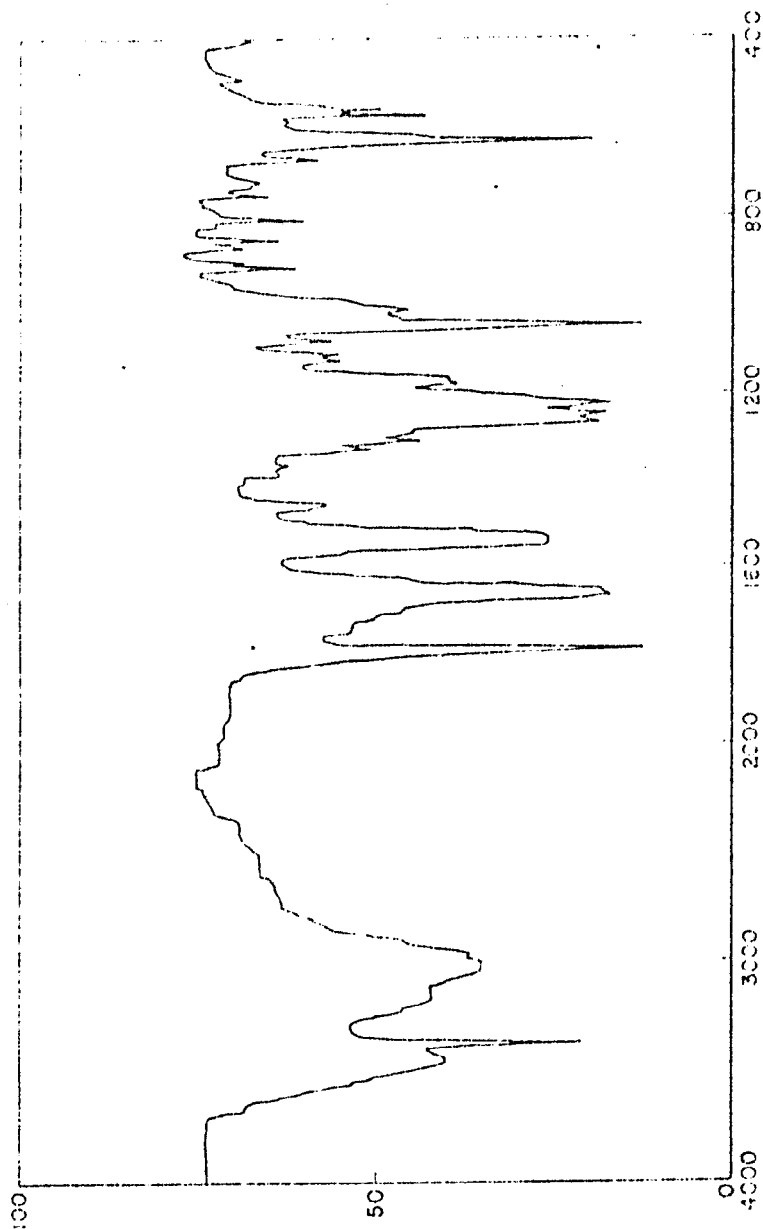
MADRID 29 DIC. 1978

RA: M. CURELL SUÑOL

Suñol

**POOR
QUALITY**

Fig. 3



MADRID 29 DIC. 1978
P. A. M. CURELL SANOL

POOR
QUALITY