

C 12 D 9/14

1er CERTIFICADO DE ADICION
SC. 3146.

Memoria Descriptiva

sobre:

Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal n^o 304.196, concedida el 13 de octubre de 1964, por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DEL ANTIBIOTICO 11.837 R.P."

- - - - -

Solicitante:

RHONE-POULENC S.A., entidad francesa, residente en 22, Avenue Montaigne, Paris-8e, Francia.

- - - - -

La presente invención se refiere a la preparación del antibiótico designado a continuación con el número 11.837 R.P.

En la patente principal se ha descrito el
5. antibiótico 11.837 R.P. y su preparación por culti-



vo en medios artificiales de un microorganismo designado por la apelación "Streptomyces viridans DS 9466" (N.R. R.L. 3.087).

5. Se ha comprobado después, por exámen cromatográfico sobre papel y sobre capa delgada, así como por electrofóresis, seguidas de revelación microbiológica, que el 11.837 R.P. es, de hecho, una mezcla de varios constituyentes que poseen propiedades biológicas y fisico-químicas muy próximas.
10. La presente invención se refiere a la preparación del antibiótico 11.837 R.P. por cultivo en condiciones aerobias de dos nuevos microorganismos, identificados más completamente a continuación. Estos dos nuevos microorganismos, que muestran caracteres muy próximos entre sí, pertenecen al género Streptomyces y, dentro de este género, pertenecen a la especie Streptomyces venezuelae, de la que constituyen una variedad a la cual se ha dado la apelación Streptomyces venezuelae, variedad fulvofurvescens.
15. Se designarán respectivamente estos dos microorganismos por las denominaciones "S. venezuelae, var. fulvofurvescens DS 7.103" (NRRL 3354) y "S. venezuelae, var. fulvofurvescens DS 11.355" (NRRL 3355).
20. El "Streptomyces venezuelae, var. fulvofurvescens DS 7.103" se ha aislado a partir de una muestra de tierra tomada en Argelia, en Argel, y el "Streptomyces venezuelae, var. fulvofurvescens DS 11.355" se ha aislado a partir de una muestra de tierra tomada en Inglaterra, en la región de Gloucester.
25. Se designarán respectivamente estos dos microorganismos por las denominaciones "S. venezuelae, var. fulvofurvescens DS 7.103" (NRRL 3354) y "S. venezuelae, var. fulvofurvescens DS 11.355" (NRRL 3355).
30. El "Streptomyces venezuelae, var. fulvofurvescens DS 7.103" se ha aislado a partir de una muestra de tierra tomada en Argelia, en Argel, y el "Streptomyces venezuelae, var. fulvofurvescens DS 11.355" se ha aislado a partir de una muestra de tierra tomada en Inglaterra, en la región de Gloucester.



1968

Su aislamiento se realizó utilizando el método clásico siguiente:

- se puso la tierra extraída en suspensión en agua destilada estéril, y se diluyó después la suspensión en diferentes concentraciones; se extendió un pequeño volúmen de cada dilución sobre la superficie de cajas de Pétri contentivas de un medio nutritivo gelosado.
- 5.

- Después de una incubación de algunos días a 26°C, se transplantan las colonias de microorganismos que se quieren aislar, sobre gelosas inclinadas, con el fin de obtener cultivos más abundantes.
- 10.

- Los nuevos microorganismos productores de 11.837 R.P. pertenecen al género *Streptomyces*, y más particularmente constituyen una variedad de la especie *Streptomyces venezuelae* a la que les ligan sus caracteres esenciales.
- 15.

- El conjunto de los caracteres siguientes que los mismos presentan está, en efecto, de acuerdo con los de la especie *S. venezuelae* descritos por una parte en "The Actinomycetes" vol. 2 (S. A. WAKSMAN, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1961), págs. 280-281, y por otra parte, en el "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (7ª edición - The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1957) página 780-781: producción de pigmento melánico negro sobre medio apropiado a la tirosina y producción de pigmento soluble castaño negro sobre la mayor parte de los medios orgánicos, coloración amarillo oscuro a pardo oscuro del micelio ve-
- 20.
- 25.
- 30.



getativo sobre el conjunto de sus cultivos, color rosa del micelio aéreo esporulado, organización del aparato esporífero que consiste en la producción de esporoforos muy alargados, rectos o ligeramente flexuosos.

5. Difieren de la especie-tipo de S. venezuelae en que muestran algunas diferencias en las fuentes de carbono que son susceptibles de utilizar para asegurar su desarrollo, no dan como producción antibiótica cloranfenicol sino 11.837 R.P., y sobre todo, producen abundantemente un pigmento soluble oscuro, de color pardo anaranjado, que se hace rápidamente más y más oscuro para llegar hasta el negro, y pudiendo colorear a la vez el micelio vegetativo y el medio de cultivo. S. venezuelae produce un pigmento bastante semejante en cierto número de casos, pero en general lo hace en cantidad más moderada e incluso deja de hacerlo en cierto número de casos en que lo producen los nuevos microorganismos (en particular en ciertos medios sintéticos). Por tal razón se han denominado estos últimos Streptomyces venezuelae, variedad fulvofurvescens.
- 10.
- 15.
- 20.

- Los caracteres de cultivo y las propiedades bioquímicas de S. venezuelae, var. fulvofurvescens, raza DS 7.103 se han examinado en cierto número de gelosas nutritivas y de caldos nutritivos habitualmente utilizados para examinar el aspecto de las razas de Streptomyces. Las observaciones se han anotado en el cuadro siguiente; salvo indicaciones precisas, se refieren a cultivos de dos a cuatro se
- 25.
- 30.



3 JUL 1968

manas a 26°C, llegados a una buena fase de desarrollo. Cierta número de los medios de cultivo empleados se han preparado según las fórmulas indicadas en "The Actinomycetes", S.A. WAKSMAN, p. 193-197,

5. Chronica Botanica Company, Waltham, Mass., U.S.A., 1950; en este caso, se han indicado por la letra W. seguida del número que se les ha atribuido en "The Actinomycetes".

Las referencias o composiciones de los

10. otros medios de cultivo son las siguientes:
- Ref: A - K.L. JONES - Journal of Bacteriology, 57, 142, 1949.
 - Ref: B - Fórmula W.23 adicionada con 2 % de gelsa.
15. - Ref: C - "Hickey and Tresner's Agar" - T.G.PRIDHAM et col. - Antibiotics Annual, 1956-1957, p.950.
- Ref: D - "Yeast Extract Agar" - T.G. PRIDHAM et col. - Antibiotics Annual, 1956-1957, p. 950.
 - Ref: E - "Tomato Paste Oatmeal Agar" - T.G.PRIDHAM et col. - Antibiotics Annual, 1956-1957, p. 950.
20. - Ref: F - The Actinomycetes, vol 2, p. 333 - Nº 42 S.A. WAKSMAN - The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1961.
25. - Ref: G - W.E. GRUNDY et col. - Antibiotics and Chem. 2, 401, 1952.
- Ref: H - "Inorganic Salts - Starch Agar" - T.G. PRIDHAM et col. - Antibiotics Annual, 1956-1957, p. 951.
30. - Ref: I - corresponde a la fórmula W 1, en la que



30 g de sacarosa se reemplazan por 15 g de glucosa.

- 5. - Ref: J - corresponde a la fórmula W 1, en la que 30 g de sacarosa se reemplazan por 15 g de glicerina.
- Ref:K - "Plain gelatin" - preparado según las indicaciones del "Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria" de la Society of American Bacteriologists, Gêneva , N.Y. II₅₀ - 18.
- 10. - Ref: L - corresponde a la fórmula W 18, en la que se suprime la sacarosa y se reemplaza por pequeñas bandas de papel filtro parcialmente sumergidas en el líquido.
- 15. - Ref: M - H.D. TRESNER y F. DANGA - Journal of Bacteriology, 76, 239-244, 1958.
- Ref. N - Leche descremada en polvo, comercial, reconstituida según las indicaciones del fabricante.



Medios de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo o envés del cultivo	Aparato aéreo (comprende el conjunto del micelio aéreo y de la esporulación)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bioquímicas
Gelosa de Bennett (Ref.A)	Bueno	Envés pardo anaranjado muy pronunciado a pardo negruzco	Rosa claro. Bien desarrollado	Pardo anaranjado muy acusado que llega hacia el pardo negruzco	Esporoforos rectos o ligeramente flexuosos bastante largos. Esporas cilíndricas de extremos redondeados, que miden de 0,3 a 0,5 μ /0,8 a 1,2 μ
Gelosa de Emerson (Ref.B)	Bueno	M.v. pardo amarillo. Grueso y fruncido, muy bien desarrollado	Blanquecino. De desarrollo pobre.	Pardo anaranjado muy pronunciado que llega hacia el pardo negruzco	
Gelosa de Hickney y Tresner (Ref.C)	Muy bueno	Envés pardo negro	Rosa claro. Muy bien desarrollado	Negro	
Gelosa con extracto de levadura de Pridham (Ref.D)	Muy bueno	Envés negro	Rosa claro muy bien desarrollado	Negro	
Gelosa con avena y tomate de Pridham (Ref.E)	Muy bueno	Envés pardo amarillo muy pronunciado	Rosa claro. Muy bien desarrollado	Pardo negruzco	



Medios de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo o envés del cultivo	Aparato aéreo (comprendido el conjunto del micelio aéreo y de la esporulación)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bioquímica
Gelosa glucosa peptona (W-7)	Bastante bueno	Envés pardo anaranjado muy pronunciado, casi negruzco	Blanco-grisáceo. Moderadamente desarrollado	Pardo negro	
Gelosa nutritiva (W-5)	Medio	M.v. pardo amarillo grisáceo. Bastante bien desarrollado	Nulo	Pardo amarillo	
Gelosa tirosina-extracto de la vadura para formación de melanina (Ref.F)	Bastante bueno	M.v. negro Envés negro	Blanco rosado a grisáceo. En estado de indicios.	Negro intenso	Formación de melanina: positiva desde las 48 horas del cultivo
Gelosa con malato de calcio de Krainky (Ref.G)	Bastante bueno	Envés amarillo pardo claro	Rosa pálido. Medianamente desarrollado	Gris parduzco poco intenso	Solubilización del malato de calcio: buena.
Gelosa glucosa asparagina (W-2)	Bueno	Envés negro	Rosa muy claro. Moderadamente desarrollado	Pardo negruzco	



Medios de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo o envés del cultivo	Aparato aéreo (comprende el conjunto del micelio aéreo y de la esporulación)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bioquímicas
Gelosa Glicerina-asparagina (W-3)	Bueno	Envés pardo anaranjado a pardo negro	Blanquecino a rosa muy claro. Moderadamente desarrollado	Pardo anaranjado muy intenso, casi pardo negro	
Gelosa con almidón de Pridham (Ref.H)	Bueno	Envés pardo amarillo	Rosa muy pálido. Bien desarrollado	Eris parduzco débil	Esporóforos rectos o ligeramente flexuosos bastante largos. Esporas cilíndricas de extremos redondeados, que miden 0,3 a 0,5 μ /0,8 a 1,2 μ . Hidrólisis del almidón: positiva
Gelosa sintética de Czapek con sacarosa (W-1)	Bueno	Envés negro. M.v.grueso, bien desarrollado	Blanco-grisáceo. Moderadamente desarrollado	Pardo anaranjado muy pronunciado, casi negro	
Gelosa sintética de Czapek con glucosa (Ref.I)	Bueno	Envés pardo anaranjado muy acusado. M.v.grueso, bien desarrollado	Blanco-grisáceo. Moderadamente desarrollado	Pardo anaranjado muy pronunciado	



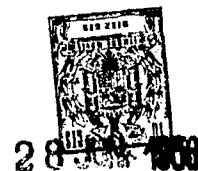
Medios de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo o envés del cultivo	Aparato aéreo (comprende el conjunto del micelio aéreo y de la esporulación)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bioquímicas
Gelosa sintética de Czapek con glicerina (Ref.J)	Bueno	Envés negro. M.v.grueso y fruncido, bien desarrollado	Blanco grisáceo. Moderadamente desarrollado	Pardo anaranjado muy pronunciado, casi negro	
Cultivo sobre patata (W-27)	Muy bueno	M.v. negro. Muy grueso y muy fruncido	A. a. rosado grisáceo claro, en estado de indicios	Negro	
Gelatina pura al 12 % (Ref.K)	Bueno	Buen desarrollo en superficie. Envés pardo amarillado	Rosa grisáceo. Medianamente desarrollado	Pardo anaranjado	Licuefacción de la gelatina bastante rápida.
Caldo almidón nitrato (W-19)	Bueno	Velo bien desarrollado. Envés pardo anaranjado intenso	Blanquecino. Muy moderadamente desarrollado	Pardo anaranjado en pequeña cantidad a partir de la superficie	Reducción de los nitratos en nitratos: positiva
Caldo de Czapek con celulosa (Ref.L)	Moderado pero positivo		Blanco-rosado, sobre el papel que emerge del caldo.		Utilización de la celulosa: positiva
Medio de Tresner y Danga (Ref.M)	Bueno	Negro	Nulo	Negro intenso. Abundante	H ₂ S: producción positiva desde las 24 horas de cultivo
Leche descremada (Ref.N)	Bueno	Anillo bien desarrollado. Castaño oscuro	Nulo	Pardo muy oscuro, casi negruzco	Peptonización iniciada al cabo de 2 semanas, casi total en 1 mes. No hay coagulación. El pH pasa de 6,3 a 7,0 en 1 mes.



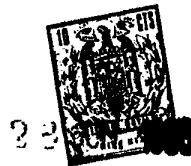
28 JUN. 1958

- S. venezuelae, var. fulvofurvescens, raza DS. 11.355 presenta caracteres semejantes a los de S. venezuelae, var. fulvofurvescens, raza DS 7.103, en los medios que se han citado en el cuadro anterior. La única diferencia notable comprobada hasta hoy en el comportamiento de estas dos razas reside en su capacidad de utilización de ciertas fuentes de carbono o de nitrógeno, ya que la raza DS 11.355 no utiliza el adonitol que utiliza la raza DS 7.103, utilizando por el contrario la sarcosina que no utiliza la raza DS 7.103.

- La capacidad de las dos razas en utilizar diversas fuentes de carbono y de nitrógeno para asegurar su desarrollo se ha determinado según el principio del método de Pridham y Gottlieb (J. of Bact. 56, 107-114, 1948); el grado de desarrollo se observó sobre el medio de base indicado por estos autores, reemplazando o bien la glucosa por las diversas fuentes de carbono respectivamente probadas, o bien $SO_4(NH_4)_2$ por las diversas fuentes de nitrógeno respectivamente ensayadas. Se indican los resultados en el cuadro siguiente:



Fuentes de carbono ensayadas	Utilización por las cepas		Fuentes de nitrógeno ensayadas	Utilización por las razas	
	DS 7.103	DS 11.355		DS. 7.103	DS 11.355
d-ribosa	+	+	NO ₃ Na	+	+
d-xilosa	+	+	NO ₂ Na	+	+
l-arabinosa	+	+	SO ₄ (NH ₄) ₂	+	+
l-ramnosa	+	+	PO ₄ H(NH ₄) ₂	+	+
d-glucosa	+	+	adenina	+	+
d-galactosa	+	+	adenosina	+	+
d-fructosa	+	+	uracilo	-	-
d-mannosa	+	+	urea	+	+
l-sorbose	-	-	l-asparagina	+	+
lactosa	+	+	glicocola	+	+
maltosa	+	+	sarcosina	-	+
sacarosa	+	+	dl-alanina	+	+
trehalosa	+	+	dl-valine	+	+
celobiosa	+	+	ácido-dl-aspartico	+	+
rafinosa	+	+	ácido l-glutámico	+	+
dextrina	+	+	l-arginina	+	+
inulina	-	-	l-lisina	+	+
almidón	+	+	dl-treonina	+	+
glicógeno	+	+	dl-metionina	-	-
glicerol	+	+	taurina	-	-
eritritol	-	-	dl-fenilalanina	+	+
adonitol	+	-	l-tirosina	+	+
dulcitol	-	-	dl-prolina	+	+
d-mannitol	+	+	l-hidroxiprolina	+	+
d-sorbitol	-	-	l-histidina	+	+
inositol	+	+	l-triptofano	+	+



Los nuevos procedimientos de preparación del antibiótico 11.837 R.P. consisten esencialmente en cultivar "Streptomyces venezuelae, var. fulvofurvescens DS 7.103" o "Streptomyces venezuelae, var. fulvofurvescens DS 11.355" en medios y en condiciones apropiados y en separar a continuación el antibiótico 11.837 R.P. bajo la forma de su sal de potasio, por ejemplo.

Las condiciones generales en las que se efectúa el cultivo de "Streptomyces venezuelae, var. fulvofurvescens DS 7.103" y de "Streptomyces venezuelae, var. fulvofurvescens DS 11.355" para la producción del antibiótico 11.837 R.P., así como los métodos de aislamiento de este antibiótico a partir de los mostos de fermentación, son idénticos a los que se han descrito en la patente principal para la preparación del 11.837 R.P. a partir de "Streptomyces viridans DS 9.466" (N.R.R.L. 3.087).

El antibiótico 11.837 R.P. producido por las cepas DS 7.103 y DS 11.355 es una mezcla, la naturaleza de cuyos constituyentes es idéntica a la de los constituyentes del antibiótico 11.837 R.P. producido por la cepa DS 9.466; sólo las proporciones relativas de los constituyentes entre sí pueden variar de una cepa a otra, o incluso dentro de una misma cepa, de un lote de producto a otro.

La puesta en evidencia de los constituyentes de las mezclas puede realizarse por métodos clásicos de análisis de mezclas de antibióticos, por ejemplo por cromatografía sobre papel y sobre capa



delgada, así como por electrofóresis, seguidas de revelación microbiológica, por ejemplo por aplicación sobre placas de gelosa sembradas.

5. Los espectros infrarrojos de los productos obtenidos por cultivo de las nuevas razas, si no son estrictamente idénticos al espectro que figura en la patente principal, presentan prácticamente las mismas bandas de absorción con tan solo algunas diferencias de intensidades relativas resultantes de las proporciones variables de los constituyentes entre sí.
- 10.

15. Los ejemplos siguientes, dados a título no limitativo, muestran como puede ponerse en práctica el invento. En cuanto aquí sigue, se determina siempre la actividad por dosis biológicas por el método de difusión utilizando *Bacillus subtilis* como germen sensible y con relación a una muestra de 11.837 R.P. puro tomada como contraste. Esta actividad se expresa en unidades /u) por mg para los productos
20. sólidos y en unidades por cm^3 para las soluciones (la unidad se define como la menor cantidad de producto que, disuelta en 1 cm^3 de un medio de cultivo apropiado, inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus* 209 P en condiciones determinadas).

25. Ejemplo 1 -

Se carga en un fermentador de 170 litros:

- | | |
|---------------------------|----------|
| - corn steep | 4,800 Kg |
| - glucosa hidratada | 2,400 Kg |
| - cloruro sódico | 0,600 Kg |
| 30. - sulfato de magnesio | 0,120 Kg |



- agua, complemento para 110 litros.

Después de haber ajustado el pH de la mezcla a 7,30 con 535 cm³ de lejía sódica (d = 1,33), se añade además:

5. - Carbonato de calcio 0,600 Kg.

Se esteriliza entonces el medio de cultivo a pH 7,30 por borbotado de vapor a 122°C durante 40 minutos. Tras enfriamiento, el volumen del caldo es de 120 litros y el pH de 6,90. El medio se siembra con 10. 200 ml de un cultivo, en erlenmeyer agitado, de la cepa *Streptomyces venezuelae* var. *fulvofurvescens* DS 7.103. Se desarrolla el cultivo a 30°C durante 15. 28 horas agitando y aireando con aire estéril; resulta entonces adecuado para la siembra del cultivo productor.

Se efectúa el cultivo productor en un fermentador de 800 litros cargado con las siguientes sustancias:

	- corn steep	20	Kg
20.	- almidón	7,500	Kg
	- aceite de soja	7,500	litros
	- fosfato monopotásico	1	Kg
	- sulfato de magnesio	1	Kg
	- cloruro de cobalto hidratado	0,010	Kg
25.	- agua, complemento para	460	litros

Tras haber ajustado el pH de la mezcla a 7,15 con 2800 ml de sosa concentrada (d = 1,33), se añade además:

- carbonato de calcio 5 Kg

30. Se esteriliza el medio de cultivo a pH



- 7,35 por borboteo de vapor a 122^oC durante 40 minutos. Después del enfriamiento, el volúmen es de 490 litros y el pH de 7,05. Se siembra entonces con 50 litros del cultivo inoculum en fermentador de 170
5. litros descrito más arriba. Se efectúa el cultivo a 30^oC durante 96 horas, agitando con ayuda de una turbina que gira a 285 v/m y aireando con un caudal de aire estéril de 25 m³/h. el pH del medio es entonces de 8,55 y el volumen del mosto de 420 litros. La
10. cantidad de antibiótico presente es de 1820 u/cm³.

Ejemplo 2

- Se toman 420 litros de mosto de cultivo de *Streptomyces venezuelae*, var. *fulvofurvescens* DS 7.103 preparado como se ha descrito en el ejemplo 1,
15. y se ajustan a un pH 4 con ayuda de ácido fosfórico en una cuba agitada. Después de media hora de agitación, se añaden 20 Kg de Clarcel DIC al mosto y se envía la suspensión sobre un filtro-prensa. Tras filtración, la torta micélica se lava en el filtro
20. con 200 litros de agua. Se desechan el filtrado y el agua de lavado unidos (volumen total 550 litros). Se toma la torta húmeda cuyo peso es de 113 Kg y se pone en suspensión en una mezcla de 250 litros de metanol y 50 litros de agua en una cuba con agitación.
25. Se ajusta el pH de la suspensión a 7 por medio de sosa (d = 1,33) y se mantiene la agitación una hora. Después de este tiempo, se envía la suspensión sobre un filtro-prensa y se lava la torta con 50 litros de metanol que contienen un 30 % de
30. agua.



5. Se desecha el micelio agotado cuyo peso es de 96 Kg. Se concentra el extracto metfílico del micelio (volumen total 360 litros) bajo presión reducida (40 mm de mercurio) en un aparato de reciclado continuo, hasta un volúmen de 6 litros. Se precipita entonces el concentrado, por medio de una mezcla de 30 litros de etanol y 40 litros de acetona.

10. Se orea el precipitado, se lava y se seca en estufa bajo vacío, y se obtienen así 780 g de un producto cuya titulación es de 515 u/mg.

Ejemplo 3

15. Se disuelven 780 g del antibiótico preparado según se ha descrito en el ejemplo 2 y de una titulación de 515 u/mg, en 10 litros de agua destilada.

20. Se filtra la solución sobre un lecho de sílice fósil y se pasa después por una columna (diámetro interior = 9 cm) que contiene 6 litros de resina Dowex 1X2 en ciclo cloro. Se lava la columna sucesivamente con

- agua destilada, hasta que el efluente sea incoloro 6 litros
- mezcla ácido fórmico-agua (10-90 en volumen) 20 litros
- 25. - mezcla ácido fórmico-agua-metanol (10-10-80 en volumen) 20 litros
- mezcla metanol-agua (80-20 en volumen) 20 litros

Se eluye entonces el antibiótico con la mezcla metanol-agua (80-20 en volumen) con adición de 10 g/l de cloruro de potasio.

30. Se recogen fracciones de 10 litros; las



fracciones más activas (2 a 6) se reagrupan y se concentran bajo presión reducida a una temperatura inferior a 40°C hasta obtener un volumen final de 3 litros.

5. Se dializa el concentrado 48 horas contra 40 litros de agua destilada renovada tres veces por intermedio de una membrana de Cellophane, para eliminar las sales y diversas impurezas, y después se liofiliza.
10. Se obtienen así 27 g de antibiótico purificado, bajo la forma de sal de potasio, con una ti tulación de 12.300 u/mg y con los caracteres físico químicos siguientes:
- Aspecto: polvo amorfo color crudo rosado fácilmente soluble en el agua.
 - Espectro ultravioleta: determinación a partir de una solución de 50 mg/l en el agua: un máximo de absorción a 255nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 106,5$).
 - Su composición elemental está próxima a la siguiente:
15. te:
- | | | |
|-----------|-----------|----------------------------|
| C% = 46,9 | H% = 6,65 | O% = 36,9 (por diferencia) |
| N% = 4,5 | P% = 2,1 | K% = 2,95 |
- 20.

Ejemplo 4

25. Se prepara en un fermentador de 170 litros el medio de cultivo inoculum como se ha dicho en el ejemplo 1. El medio, cuyo pH después de esterilización es de 7,0 se siembra con 200 ml de un cultivo en erlenmeyer agitado de la cepa *Streptomyces venezuelae* var. *fulvofurvescens* DS 11.355. Se desarrolla
30. el cultivo durante 30 horas en las condiciones de



agitación, de aireación y de temperatura descritas en el ejemplo 1.

5. Se efectúa el cultivo productor en un fermentador de 800 litros cargado con 500 litros del medio descrito en el ejemplo 1. Este medio, cuyo pH tras la esterilización, es de 6,90, se siembra con 50 litros del cultivo inoculum en fermentador de 170 litros arriba descrito . Después de 99 horas de cultivo en las condiciones de agitación, de aireación y de temperatura empleadas para el cultivo del ejemplo 1, pH del medio es de 8,45 y el volúmen del mosto de 495 litros. La cantidad de antibiotico presente es de 1520 u/ml.
- 10.

Ejemplo 5

15. Se tratan 495 litros de mosto de cultivo de *Streptomyces venezuelae* var. *fulvofurvescens* DS 11.355 como se ha descrito en el ejemplo 2.

Se obtienen 480 g de antibiotico bruto de una titulación de 1000 u/mg.

20. Ejemplo 6

470 g del antibiotico bruto preparado como se ha descrito en el ejemplo 5 y de una titulación de 1000 u/mg. son tratados como en el ejemplo 3.

25. Se obtienen entonces 14,6 g de antibiotico purificado bajo la forma de sal potásica, de una titulación de 19.400 u/mg y con los caracteres fisicoquímicos siguientes:

- Aspecto: polvo amorfo blanquecino fácilmente soluble en agua.
- 30. - Espectro ultravioleta: determinación a partir de



una solución a razón de 50 mg/l en agua:
un máximo de absorción a 256 nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 120$).

- Su composición elemental es la siguiente:

5. C% = 46,4 H% = 6,35 N% = 4,1 P% = 2,3 K% = 6,9
O% = 33,95 (por diferencia).

N O T A

- Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una Solicitud de Adición, presentada en Francia, con fecha 30 de junio de 1967, bajo el número PV. 112.713; acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento, y por lo que se solicita ler.
10. Certificado de Adición sobre: "Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal nº 304.196, concedida el 13 de octubre de 1964, por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DEL ANTIBIOTICO 11.837 R.P."; caracterizándose por lo siguiente:
15. 1ª.- Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal nº 304.196, concedida el 13 de octubre de 1964, por: Procedimiento para la preparación del antibiótico 11.837 R.P., por fermentación de un streptomyces en las condiciones habituales, ca
20. racterizádás porque se cultiva una cepa selecciona-
25. 30.

28 JUN



da del género consistente en *Streptomyces venezuelae*, var. *fulvofurvescens* DS 7.103, NRRL 3354, y *Streptomyces venezuelae*, var. *fulvofurvescens* DS 11.355, NRRL 3355.

5. 2ª.- Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal nº 304.196, concedida el 13 de octubre de 1964, por: Procedimiento para la preparación del antibiótico 11.837 R.P., tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

10. Esta Memoria consta de 21 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid

RHONE-POULENC S. A.

A. GOMEZ ACEBO Y MODEY
P. P. Fernández F. Hernández Ruiz

28 JUN 1968

- 15.