

PATENTE DE INVENCION

SC. 4350.

Int. Cl.³: C07C 161K' C07D

432340

Memoria Descriptiva

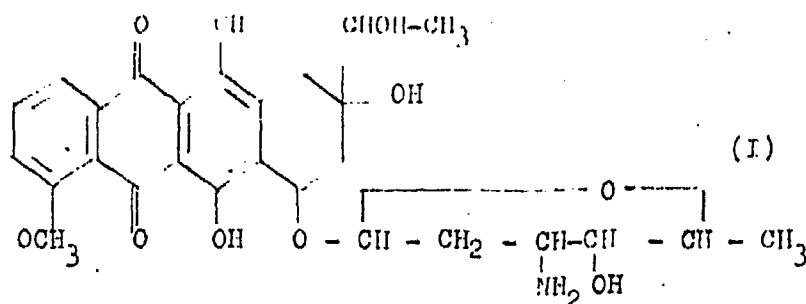
sobre:

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR EL ANTIBIOTICO 20.798 R.P.

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

El presente invento se refiere a un nuevo procedimiento de preparación del antibiótico designado por el número 20.798 R.P. que presenta interesantes propiedades antitumorales y que responde a la fórmula:

EAD ORIGINAL



5.

El antibiótico 20.798 R.P. y su preparación a partir de un caldo de cultivo de *Streptomyces coeruleorubidus* (NRRL 3045) se han descrito en la patente francesa 1.583.752.

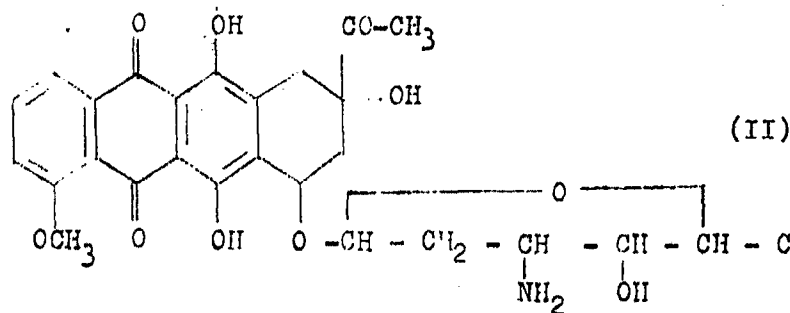
10.

El antibiótico 20.798 R.P. se produce al lado del antibiótico designado por el número 1.865 R.P. cuyo constituyente esencial es el antibiótico designado por el número 13.057 denominado "daunorrubicina".

15.

La daunorrubicina y su preparación han sido descritas en la patente belga 632.391.

La daunorrubicina responde la fórmula:



20.

25.

El antibiótico 20.798 R.P. puede obtenerse también por reducción de la daunorrubicina o de una de sus sales por medio de un borohidruro alcalino a una temperatura comprendida entre -20 y $+30^{\circ}\text{C}$ según el procedimiento que se describe en la patente francesa publicada bajo el número 2.122.695.

30.

Se ha encontrado ahora, y esto es lo que constituye el objeto del presente invento, que el antibiótico 20.798 R.P.

puede obtenerse por reducción microbiológica de la daunorrubicina.

5. Generalmente la reducción se efectúa en medio acuoso bien sea mediante cultivos de microorganismos llegados a un estado conveniente de desarrollo o de células aisladas de estos cultivos, o bien de extractos enzimáticos obtenidos a partir de estas células.

10. Los microorganismos que pueden utilizarse según el procedimiento del presente invento pueden pertenecer a la categoría de los estreptomicetos o de las bacterias. Entre los microorganismos particularmente idóneos pueden citarse *Streptomyces lavendulae* (ATCC 8664), *Streptomyces roseochromogenes* (ATCC 13400), *Corynebacterium simplex* (ATCC 6946) o *Bacterium cyclooxydans* (ATCC 12673), obteniéndose los mejores resultados a partir de cultivos de *Corynebacterium simplex* (ATCC 6946).

20. El cultivo del microorganismo que produce el sistema enzimático capaz de reducir la daunorrubicina en antibiótico 20.798 R.P. puede efectuarse por cualquier método de cultivo aerobio en superficie o en profundidad, si bien se prefiere este último por razones de comodidad. Se utilizan a tal fin las técnicas de siembra y de fermentación y los diferentes tipos de aparatos que son de uso corriente en la industria de las fermentaciones.

25. El medio de cultivo del microorganismo debe contener esencialmente fuentes de carbono y de nitrógeno asimilables, elementos minerales y factores de crecimiento, pudiendo aportarse todos estos elementos en forma de productos bien definidos o por mezclas complejas tales como las que se encuentran en productos biológicos de orígenes diversos.

30. Como fuentes de carbono asimilable pueden utilizarse

5. hidratos de carbono tales como glucosa u otras sustancias hidrocarbonadas como azúcares alcoholes o como ciertos ácidos orgánicos. Ciertos aceites animales o vegetales como aceite de grasa o aceite de soja pueden ventajosamente reemplazar estas fuentes hidrocarbonadas o unirse a las mismas.

10. Las fuentes de nitrógeno asimilable son extremadamente variadas. Pueden ser sustancias químicas muy simples como las sales minerales u orgánicas de amonio, la urea y ciertos ácidos aminados. Pueden ser también aportadas por sustancias complejas que contengan principalmente nitrógeno en forma proteídica: caseína, lactalbumina, gluten y sus hidrolisatos, harinas de soja, cacahuete, pescados, peptona, extractos de carne, levadura, solubles de destilerías, com-steep.

15. Entre los elementos minerales agregados, algunos de ellos pueden tener un efecto tampón o neutralizante como los fosfatos alcalinos o alcalino-térreos. Otros aportan el equilibrio iónico necesario para el desarrollo del microorganismo como los cloruros y los sulfatos de metales alcalinos o alcalino-térreos.

20. El valor pH del medio de fermentación al comienzo del cultivo debe hallarse comprendido entre 6,0 y 7,0, con preferencia entre 6,5 y 7,5. La temperatura óptima para el cultivo del microorganismo es 29-31°C pero se obtiene un desarrollo satisfactorio a temperaturas comprendidas entre 26 y 37°C.

25. La aireación del medio de cultivo puede variar entre valores bastante amplios. Se ha comprobado sin embargo que aireaciones de 0,3 a 3 litros de aire por litro de cultivo y por minuto son particularmente convenientes.

30. Además, para obtener un cultivo que posea una buena

actividad reductora, es preferible agitar el medio de cultivo por ejemplo por medio de un agitador cuya velocidad de rotación puede variar entre 100 y 250 vueltas por minuto.

5. Generalmente el cultivo del microorganismo alcanza un grado de desarrollo satisfactorio tras un periodo de 24 a 48 horas.

La actividad reductora del sistema enzimático así obtenido es de una naturaleza endocelular que puede ponerse en evidencia por la ausencia de actividad de los cultivos filtrados.

10. Además la actividad reductora depende esencialmente de la cantidad de células formadas en el curso del cultivo. Con células aisladas, por ejemplo tras centrifugación del

15. medio de cultivo, la cantidad de antibiótico 20.798 R.P. formada a partir de la daunorrubicina se halla en relación directa con la concentración en células del medio reaccional; los medios ricos en células poseen un poder reductor superior.

20. La reducción de la daunorrubicina en antibiótico 20.798 R.P. se efectúa poniendo en contacto una solución acuosa de daunorrubicina o de una de sus sales con el cultivo del microorganismo que haya alcanzado un grado de desarrollo y un poder reductor suficientes; o con las células aisladas de estos cultivos, o con los extractos enzimáticos obtenidos a partir de estas células.

25. Generalmente la reducción se efectúa en medio agitado a una temperatura comprendida entre 23 y 37°C, con preferencia entre 26° y 30°C y se completa después de 1 a 4 días de contacto.

30. La reducción puede tener lugar a un valor pH comprendido entre 5 y 10, pero es preferible operar a un valor pH comprendido entre 7 y 8.

El medio de cultivo puede ser agitado, por ejemplo por un agitador cuya velocidad de rotación puede variar entre 100 y 250 vueltas por minuto.

5. La reducción puede efectuarse ya sea sobre daunorrubicina o una de sus sales, o bien sobre el filtrado ácido de un cultivo que haya producido daunorrubicina. Para obtener buenos rendimientos, la concentración de la daunorrubicina en el medio reductor se halla ventajosamente comprendida entre 0,1 y 1 g/l al comienzo de la reducción.

10. El antibiótico 20.798 R.P. puede separarse del medio de reducción según los métodos habituales de aislamiento de este antibiótico.

15. Por ejemplo el 20.798 R.P. puede extraerse del medio de cultivo a un valor pH próximo a 9 por medio de un disolvente orgánico tal como cloroformo, cloruro de metileno, n.butanol o una mezcla de estos disolventes.

20. El antibiótico 20.798 R.P. puede aislarse de los extractos orgánicos, tras lavados y extracciones sucesivas, por precipitación después de concentración de los extractos bajo un reducido volumen o por adición de un diluyente en el cual el antibiótico 20.798 R.P. es insoluble, tal como el hexano, tras transformación eventual del antibiótico en una sal de adición con un ácido tal como clorhidrato.

25. El antibiótico 20.798 R.P. puede eventualmente purificarse por las diversas operaciones clásicas de purificación tales como la cristalización o la cromatografía.

Los ejemplos siguientes, dados a título no limitativo, muestran la forma en que puede ponerse en práctica el invento. En el resto de la descripción,

30. a) los extractos coloreados son dosificados por espectrometría

- a 480 nm con relación a una solución patrón de daunorrubicina en el mismo disolvente,
5. b) la identificación del antibiótico 20.798 R.P. se efectúa por cromatografía sobre capa delgada de gel de sílice comparando los Rf de los productos obtenidos con el de la daunorrubicina o del antibiótico 20.798 R.P. en el sistema de disolvente,
10. c) la producción del antibiótico 20.798 R.P. se determina a partir de los cromatogramas sobre capa delgada, ya sea después de las intensidades comparadas de las manchas correspondientes del extracto y de la del antibiótico 20.798 R.P. puro tomado como referencia, o bien por comparación de las superficies de los picos registrados en el lector de placa "Chromosan" o bien por último dosificando colorimétricamente el antibiótico 20.798 R.P. diluido del soporte cromatográfico al nivel de la mancha del producto buscado.
- 15.

Ejemplo 1

Se prepara un medio de cultivo A cuya composición es la siguiente:

20. - polvo de autolisato de levadura de cervecería "yeast amine" 5 g
- fosfato monopotásico 1 g
- fosfato dipotásico 1 g
- agua destilada 900 cm³

25. Tras haber ajustado el valor pH a 6,9 por adición de sosa normal, se esteriliza el medio a 122°C durante 20 minutos. Después de enfriado, se agregan 100 cm³ de una solución estéril de glucosa a 50 g/l.

30. Se siembra un matraz de cultivo de 300 cm³ que contiene 50 cm³ de este medio cuyo valor pH es de 6,9 con 2,5

5. cm^3 de un cultivo inoculum de la cepa *Corynebacterium simplex* (ATCC 6946). Se desarrolla el cultivo durante 24 horas en tabla agitada a 220 v/mn en un recinto a 30°C. En el cultivo bien desarrollado, cuyo valor pH es de 7,45, se agrega entonces 1 cm^3 de una solución acuosa a 10 mg/cm^3 de clorhidrato de daunorrubicina. La fase de reducción se prosigue en el este caso durante 24 horas en las condiciones de agitación y de temperatura empleadas para el desarrollo del cultivo.
10. Una vez terminada la reducción, todo el cultivo cuyo valor pH es 8,4 es tratado por 25 cm^3 de un tampón de borato para llevar el valor pH a 9, y a continuación es extraído 2 veces con 50 cm^3 de una mezcla de cloruro de metileno-butanol normal (80-20 en volumen). Los extractos orgánicos son secados en sulfato de sodio anhidro.
15. El rendimiento de la extracción (90%) se determina por medida al espectrofotómetro de la absorción a 400 nm comparada con la de la daunorrubicina en las mismas condiciones.
20. La producción de 20.798 R.P. se determina por cromatografía de los extractos orgánicos sobre capa delgada de gel de sílice. Los volúmenes de extractos depositados corresponden a cantidades de productos coloreados, determinadas por valoración espectrofotométrica, comprendidas entre 1 y 10 μg . Las placas son reveladas con la mezcla siguiente: cloruro de metileno - ácido fórmico - metanol (80-17-3 en volumen) para obtener una buena separación de la daunorrubicina y del antibiótico 20.798 R.P. y los Rf de los productos obtenidos se comparan con los de los productos de referencia cromatografiados en las mismas condiciones. La evaluación
25. cuantitativa de la producción de 20.798 R.P. muestra que el
- 30.

cultivo de *Corynebacterium simplex* (ATCC 6946) reduce la daunorrubicina en antibiótico 20.798 R.P. con un rendimiento de 73% sobre la daunorrubicina utilizada.

Ejemplo 2

5. a) Desarrollo del cultivo y reducción

El cultivo productor se efectúa en un fermentador de 800 litros cargado con las sustancias siguientes:

- polvo de autolisato de levadura de cervcería "yeast amine" 2,50 kg.
- 10. - fosfato monopotásico 0,50 "
- fosfato dipotásico 0,50 "
- agua de ciudad q.s.p. 460 lt.

15. Tras haber ajustado el valor pH del medio a 6,90 por adición de 225 cm³ de soda 10 N, se esteriliza el medio por burbujeo de vapor a 122°C durante 40 minutos. Después de enfriado, debido a la condensación del vapor en el curso de la esterilización, el volumen del cultivo es de 494 litros; se completa a 500 litros por adición de 6 litros de una solución acuosa estéril que contiene:

- 20. - glucosa monohidratada 2,5 kg.

25. El valor pH del medio es igual a 6,90. Se siembra con 500 cm³ de un cultivo inoculum de la cepa *Corynebacterium simplex* (ATCC 6946). El cultivo es desarrollado a 30°C, agitando con una turbina que gira a 160 vueltas por minuto y aireando con un volumen de aire estéril de 18 m³/h. Después de 40 horas el cultivo es conveniente para efectuar la transformación bioquímica de la daunorrubicina en antibiótico 20.798 R.P.

30. Se introduce en el cultivo 4 litros de una solución acuosa que contiene:

- clorhidrato de daunorrubicina.

108 g.

5. Se prosigue la incubación durante 24 horas a 30°C, agitando y aireando con un volumen de aire estéril de 15 m³/h. La daunorubicina se reduce en antibiótico con un rendimiento próximo al 85%.

b) Extracción

10. A 480 litros de mosto obtenido anteriormente se agrega 55 cm³ de sosa 5 N, para llevar el valor pH de 9. El principio activo se extrae a contra-corriente por una mezcla de n.butanol-agua (6-4 en volumen) en dos centrifugadoras. El extracto cuyo volumen es de 305 litros es concentrado a presión reducida (5 a 10 mm de mercurio) a 40°C hasta un volumen de 20 litros.

15. El extracto concentrado es lavado por 10 litros de agua alcalinizada con un valor pH de 9. Una parte del antibiótico 20.798 R.P., siendo arrastrada por el agua de lavado, se extrae 2 veces por 10 litros de cloruro de metileno. A la fase clorometilénica concentrada hasta un volumen de 10 litros se agregan 10 litros de n.butanol. Después de la concentración a 5 litros, se reúnen los dos extractos butílicos y se concentran de nuevo hasta un volumen de 5 litros.

20. Se agrega entonces agitando 50 cm³ de n.butanol que contiene 10% en volumen de ácido clorhídrico 10 N y después se concentra a presión reducida (5 a 10 mm de mercurio) a 40°C hasta un volumen de 3 litros.

25.

30. El antibiótico 20.798 R.P. en forma de clorhidrato es precipitado por adición lenta de la solución obtenida en 30 litros de hexano agitando. El precipitado es escurrido, lavado y secado. Se obtiene así 105 g de clorhidrato del antibiótico 20.798 R.P.

c) Purificación

5. 159 g de clorhidrato de 20.798 R.P. obtenido como se indica anteriormente se ponen en solución en 795 cm³ de metanol. El producto que cristaliza es escurrido, lavado y después secado. Se obtiene así 111 g de clorhidrato de 20.798 R.P. cristalizado que posee una pureza de 80%.

10. 111 g del producto así obtenido son disueltos en 666 cm³ de agua. La solución es filtrada con una membrana esterilizante (diámetro de poros: 0,22 µg. El clorhidrato del antibiótico 20.798 R.P. cristaliza por adición lenta de 6,6 litros de acetona. Los cristales son escurridos, lavados y secados. Se obtiene así 93,1 g de clorhidrato del antibiótico 20.798 R.P. puro.

Ejemplo 3

15. Se prepara y se reparte en redomas de cultivo de 300 cm³ un medio de cultivo A como se describe en el ejemplo 1. Los matraces esterilizados son sembrados con un cultivo inoculum de la cepa *Corynebacterium simplex* (ATCC 6046) y puestos a incubar a 30°C sobre tabla agitada a 220 v/min durante 24 horas a 48 horas.

20. Se agrega entonces, a todo el cultivo, la daunorrubicina en forma

25. a) de una solución acuosa a 10 mg/cm³ del producto puro a razón de 1 o 2,5 cm³ por matraz (0,2 o 0,5 g/l),
b) de una solución acuosa a 10 mg/cm³ de un producto bruto que contiene 47% de 13.057 R.P. a razón de 1 ó 2,5 cm³ por matraz (0,095 o 0,24 g/l de daunorrubicina).

30. Los matraces se incuban a continuación durante al menos 24 h. en las condiciones descritas en el ejemplo 1 y se tratan de la misma forma. Los resultados son recogidos

en la tabla siguiente:

| Medio reductor: | Antibiótico 90,748 R.P. obtenido (en 5) | | | |
|----------------------------------|--|-----|----------------|------|
| | Cantidad de daunorrubicina agregada en g/l | | | |
| | Producto puro | | Producto bruto | |
| | 0,2 | 0,5 | 0,005 | 0,24 |
| 5. Cultivo completo de 24 horas | 73 | 42 | 87 | 60 |
| 10. Cultivo completo de 30 horas | 74 | 53 | 78 | 64 |
| Cultivo completo de 48 horas | 90 | 70 | 89 | 58 |

Ejemplo 4

15. Se preparan, en las condiciones descritas en el ejemplo 1, cultivos de la cepa *Corynebacterium simplex* (ATCC 6946). Con estos cultivos de un tiempo de 24 ó 30 horas, se efectúa la reducción de la daunorrubicina contenida en el filtrado oxálico de un cultivo de la cepa *Streptomyces coeruleorubidus* (NRRL 3045) productora de la daunorrubicina.

20. Este filtrado, desembarazado del ácido oxálico por un tratamiento con carbonato de calcio, contiene 90 mg/l de daunorrubicina y su valor pH es de 7,0. Se utiliza a razón de 1 volumen por 1 volumen de cultivo entero de *Corynebacterium simplex*. Los matraces que contienen 50 cm³ de esta mezcla reaccional (0,045 g/l de daunorrubicina) se incuban a continuación durante al menos 24 horas en las condiciones descritas en el ejemplo 1 y se tratan de la misma manera.

25.

30. Los cultivos de *Corynebacterium simplex* (ATCC 6946) de un tiempo de 24 y 30 horas reducen la daunorrubicina en

antibiótico 20.798 R.P. con rendimientos respectivamente de 84 y 100 % sobre la daunorrubicina utilizada.

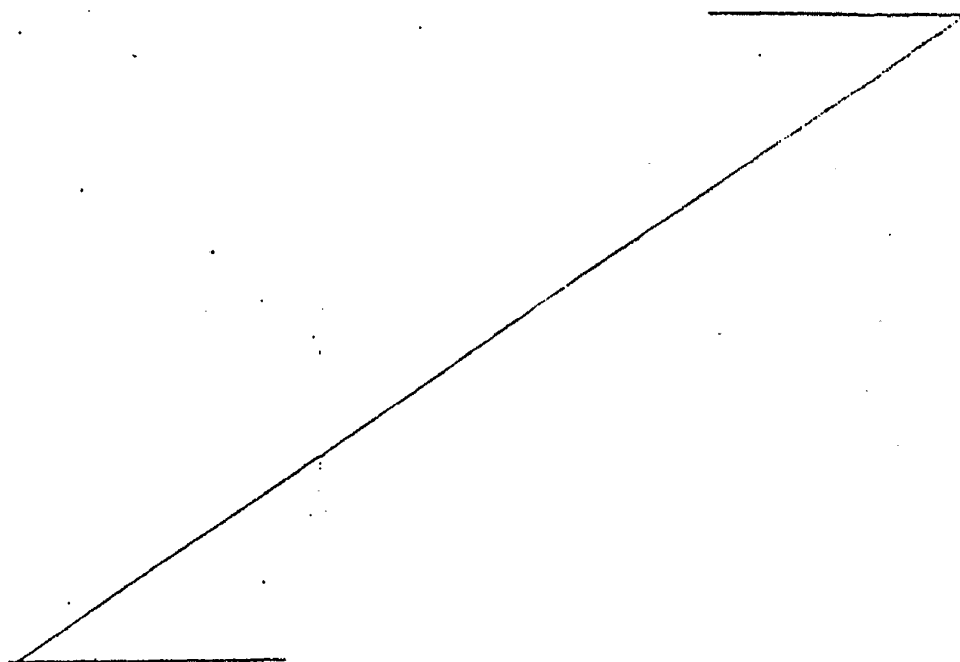
Ejemplo 5

5. Se preparan, en las condiciones descritas en el ejemplo 1, cultivos de la cepa *Corynebacterium simplex* (ATCC 6946) y se recogen por centrifugación las células producidas por estos cultivos desarrollados durante 30 horas. La reducción de la daunorrubicina (de diferentes grados de pureza) en antibiótico 20.798 R.P. se efectúa utilizando estas células en suspensión:
10. a) en 50 cm³ de un tampón de fosfato 0,15 M de un valor pH 8,0 que reciben 2,5 cm³ (0,5 g/l) de una solución acuosa de 10 mg/cm³ de daunorrubicina pura,
15. b) en 50 cm³ de tampón de fosfato 0,15 M de un valor pH 8,0 que recibe 2,5 cm³ (0,24 g/l) de una solución acuosa de 10 mg/cm³ de daunorrubicina bajo forma de un producto bruto que contiene 47% de daunorrubicina pura,
20. c) en 50 cm³ del filtrado oxálico de un cultivo de la cepa de *Streptomyces coeruleorubidus* (NRRL 3045) preparado según el tratamiento descrito en el ejemplo 3. En estas condiciones el medio reaccional contiene 0,090 g/l de daunorrubicina pura.
25. Los matraces son a continuación incubados durante 24 horas en las condiciones descritas en el ejemplo 1 y tratados de la misma manera. Los rendimientos en antibiótico 20.798 R.P. son los siguientes:
- 85% a partir de 0,5 g/l de daunorrubicina utilizada en estado puro,
- 77% a partir de 0,24 g/l de daunorrubicina utilizada en forma de un producto bruto al 47% de daunorrubicina,
30. 91% a partir de 0,090 g/l de daunorrubicina contenida en el

filtrado de un cultivo de *Streptomyces coeruleorubidus*.

Ejemplo 6

- Se utilizan cultivos inoculums de *Bacterium cyclóoxidans* (ATCC 12.673), de *Streptomyces roseochromogenes* (ATCC 13.400) y de *Streptomyces lavendulae* (ATCC 8664) para sembrar medios A, B, y C (definidos en la tabla que sigue) repartidos en matraces de cultivo de 300 cm³ a razón de 50 cm³ por matraz. Los cultivos son desarrollados a 26 ó 30°C en tablas agitadas a 220 v/mn hasta la obtención de una biomasa importante. Se agregó entonces en cada matraz 1 ó 2,5 cm³ de una solución acuosa de daunorrubicina de 10 mg/cm³ (0,2 a 0,5 g/l) y se efectúa la reducción manteniendo estos matraces, durante 1 a 3 días después de la adición, en las mismas condiciones de temperatura y de agitación que las utilizadas para el desarrollo del cultivo. Los cultivos son tratados y analizados en las condiciones descritas anteriormente. Los resultados se recogen en la tabla siguiente:



| 5. | Microorganismos utilizados | Medio de desarrollo (composición en g/l) | Condiciones utilizadas para el desarrollo y la reducción (temperatura; agitación) | Edad de los cultivos en el momento de la adición de daunorrubicina | antibiótico 20798 RP | |
|-----|---|--|---|--|----------------------|--------------------------------|
| | | | | | obtenido en | daunorrubicina agregada en g/l |
| 10. | B. cyclooxydans (ATCC 12673) | Medio A : yeast amina 5 glucosa 5 fosfato monopotásico 1 fosfato dipotásico 1 | 30°C ; 220v/mn | 24 horas 30 horas | 72 72 | - 19 |
| 15. | S. roseochromogenes (ATCC 13400) | Medio B : harina de soja 20 glucosa 4,1 aceite de soja 5,0 fosfato dipotásico 1,0 carbonato cálcico 2,5 | 26°C ; 220v/mn | 30 horas 34 horas | 35 46 | 52 32 |
| 20. | S. lavendulae | Medio C : harina de soja 30 glucosa 50 aceite de soja 5 fosfato monopotásico 1 carbonato cálcico 2,5 | 26°C ; 220 v/mn | 30 horas 54 horas | 29 30 | 31 21 |
| 25. | <u>EJEMPLO 7</u> | | | | | |
| 30. | 50 cm ³ de un cultivo de Corynebacterium simplex (ATCC 6946), desarrollado durante 30 horas en las condiciones | | | | | |

que se han descrito en el ejemplo 2, se transfieren esterilmente en un erlenmeyer de 300 cm³. Tras haber ajustado el pH a 7, se añaden 0,25 g de lisozima y se coloca el recipiente a 37°C, durante 1 hora, sobre un agitador que gira a 220 vueltas/minuto. Tras centrifugación, se añaden al líquido sobrenadante 10 mg de clorhidrato de daunorubicina. La solución así obtenida se incuba en las condiciones que se han descrito en el ejemplo 1. Tras 16 horas, la daunorubicina se reduce en antibiótico 20 798 R.P. con un rendimiento del 24 %.

10. EJEMPLO 8

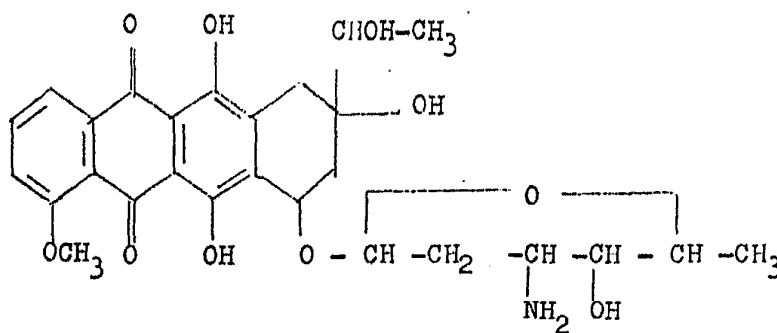
50 cm³ de un cultivo de *Corynebacterium simplex* (ATCC 6946), desarrollado durante 30 horas en las condiciones que se han descrito en el ejemplo 2, se transfieren esterilmente en un erlenmeyer de 300 cm³. Tras haber ajustado el pH a 7, se somete el cultivo a la acción de ultra-sonidos (25 kHz) durante 15 minutos a una temperatura próxima a 0°C. Tras centrifugación, se añade al líquido sobrenadante 10 mg de clorhidrato de daunorubicina. La solución así obtenida se incuba en las condiciones descritas en el ejemplo 1. Tras 16 horas, la daunorubicina se reduce a antibiótico 20 798 R.P. con un rendimiento del 73 %.

N O T A

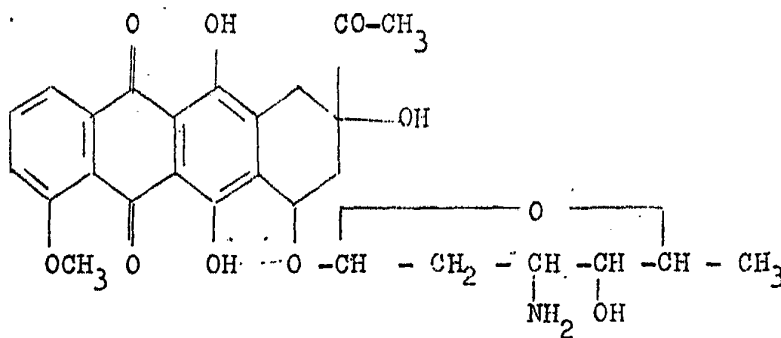
25. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una Solicitud de Patente, presentada en Francia, con fecha 27 de Noviembre de 1973, bajo el número 73 42191; acogiéndose por lo tanto a los beneficios

que condescienden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita patente de invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR EL ANTIBIOTICO 20.798 R.P.; caracterizándose por lo siguiente:

1.- Procedimiento para preparar el antibiótico 20.798 R.P., que responde a la fórmula:



15. o sus sales, caracterizado porque se reduce por vía enzimática la daunorrubicina de fórmula:



25. o una de sus sales.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se reduce la daunorrubicina por vía microbiológica.

3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque la reducción se efectúa por medio de un

30.

cultivo de un microorganismo escogido entre Streptomyces lavendulae (ATCC 8664); Streptomyces roseochromogenes (ATCC 13.400), Corynebacterium simplex (ATCC 6946) o Bacterium cyclooxydans (ATCC 12.673).

5.

4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la reducción se efectúa por medio de un extracto enzimático obtenido a partir de un cultivo de un microorganismo elegido entre S. lavendulae (ATCC 8664), S. roseochromogenes (ATCC 13400), Corynebacterium simplex

10.

(ATCC 6946) o Bacterium cyclooxydans (ATCC 12673) o a partir de células asiladas de tal cultivo.

5.- Procedimiento para preparar el antibiótico 20.798 R.P., tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

15.

Esta Memoria consta de 18 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 15 ENE. 1975

RHONE-POULENC S.A.

L. GÓMEZ ACEBO Y ASOCIADOS
p. Firmados L. Gómea Fernández

