

26-11-74

C. 9819

330520

PATENTE DE INVENCION
=====

a favor de

MERCK & CO., INC. - de nacionalidad norteamericana - domiciliada en 126 East Lincoln Anenue, RANAY, New Jersey, (EE.UU.)

por:

"Procedimiento para producir un antibiótico".

-----:oOo:-----

Memoria descriptiva



Esta invención se refiere a un nuevo agente antibiótico, sus sales, el método para prepararlo y su uso. Más particularmente, la presente invención concierne un nuevo compuesto antibiótico altamente activo, conocido como ametobotromicina, sus sales, el procedimiento para prepararlo, y su uso como agente antibiótico en el tratamiento de enfermedad respiratoria crónica de los pollos y la sinusitis infecciosa de los pavos.

El descubrimiento de las notables propiedades antibióticas de la penicilina y sustancias similares ha estimulado un gran interés en el campo de los compuestos antibióticos tales como: estreptomina, gramicidina, subtilina, bacitracina, clorotetraciclina, oxitetraciclina, cicloserina, colistina, fervenulina, estreptozotocina, novobiocina y similares. En general, tales antibióticos son particularmente activos contra ciertas bacterias gram-positivas. Otros son activos contra bacterias gram-negativas y algunos son activos tanto contra bacterias gram-negativas como contra bacterias gram-positivas. Sin embargo, la actividad de estos antibióticos conocidos está habitualmente limitada a unos pocos microorganismos patógenos y se han realizado trabajos de investigación en este campo en un intento de encontrar sustancias antibióticas adicionales que sean efectivas contra otros patógenos.

Además, muchas bacterias que, por una vez, han sido dominadas por antibióticos conocidos, han desarrollado resistencia aumentada a través de los años a estas sustancias antibióticas. Como resultado, aunque algunos de estos antibióticos han resultado inapreciables en el tratamiento de varias enfermedades, se ha descubierto que ciertas cepas de algunos patógenos desarrollan una resistencia a varios antibióticos



particulares y, en consecuencia, estos antibióticos ya no son activos contra tales cepas de patógenos o la actividad de estos antibióticos se ha reducido en tal grado que hace que su uso contra tales patógenos sea de consecuencias insignificantes.

5

De acuerdo con esto, la deficiencia de los antibióticos conocidos ha estimulado la investigación posterior para encontrar otros antibióticos que sean altamente activos contra una amplia gama de patógenos así como contra las cepas de varios microorganismos que son resistentes a otros antibióticos. Esto es cierto no solamente con las bacterias productoras de enfermedades que atacan al hombre, sino también con las bacterias productoras de enfermedades que atacan a los animales y a las aves de corral.

10

15

La enfermedad respiratoria crónica es una enfermedad de los pollos y de los pavos, causada por cierto grupo de microorganismos conocidos como PPLO o "pleuropneumonia-like organisms", que han sido clasificados como Mycoplasma. Esta enfermedad es conocida como infección PPLO. En los pollos la enfermedad puede complicarse por un invasor secundario, en cuyo caso la enfermedad se conoce como enfermedad compleja respiratoria crónica. En los pavos esta enfermedad aparece en dos formas. Se llama sinusitis infecciosa cuando se encuentra en la forma que afecta la porción superior del árbol respiratorio y enfermedad del saco aéreo cuando la afecta la porción inferior del árbol respiratorio. Con propósitos de simplicidad, estas enfermedades se designarán en esta memoria como sinusitis infecciosa.

20

25

30

En los pollos los síntomas de la enfermedad crónica respiratoria pueden ser similares a los de otras enfermedades

respiratorias tales como las Newcastle, bronquitis infecciosa, laringotraqueitis, infección fúngica, etc. Los síntomas habitualmente observados son descarga nasal y ligera hinchazón debajo de los ojos. Estos signos suelen acompañarse de dos estornudos y un ruido ronco en la garganta e un estertor. Los síntomas de la enfermedad en los pavos aparecen a menudo acompañados de senos hinchados con exudación gelatinosa, ojos llorosos y toses con sacos aéreos gaseosos o turbios.

La pérdida económica que acompaña a la enfermedad respiratoria crónica es una merma en la producción de huevos de por lo menos 10% a 40%, que afecta a las aves durante varias semanas o meses. La poca incubabilidad de los huevos fértiles puesto por gallinas infectadas puede causar pérdidas adicionales. La infección causada por el Mycoplasma (PFLO) ocasiona la muerte de un alto porcentaje de los embriones. La pérdida de peso en un gran porcentaje de aves es también evidente. Hay, además, una cifra significativa en la mortalidad de las aves que comienza a alrededor de las cuatro semanas de edad.

La infección de las aves puede ocurrir de una diversidad de maneras. Las aves pueden infectarse por contacto con otras aves infectadas, habitualmente por inhalación de exudado nasal de un ave que estornuda; en efecto, los pollos o pavos infectados pueden enfermarse y transformarse en vehículos que parecen ser sanos pero están, en realidad, infectados con cepas patógenas de Mycoplasma (PFLO). Además, las aves pueden infectarse por medio de nidos, estiércol, agua y alimentos contaminados, gallinas cluecas o incubadoras contaminadas. La transmisión de la enfermedad por medio del huevo embrionado infectado contribuye ampliamente a la obtención de generacio-

0001174

nes infectadas.

La quimioterapia de estas enfermedades ha sido exitosa con un número muy limitado de compuestos. Con una excepción, los agentes que han sido encontrados satisfactorios son antibióticos conocidos usados clínicamente para otras enfermedades, principalmente enfermedades humanas. La excepción es el antibiótico tilosina. Aunque la tilosina se usa muy ampliamente, se han encontrado cepas de FPLO resistentes a ellas y el antibiótico ha demostrado ser tóxico cuando se usa con los pavos.

Otros antibióticos útiles para dominar la enfermedad respiratoria crónica de los pollos y la sinusitis infecciosa de los pavos son la eritromicina y la clorotetraciclina u oxitetraciclina. Sin embargo, los niveles de dosis de estos antibióticos necesarios para obtener buenos resultados son demasiado altos, lo que origina un impedimento económico para el usuario. Otros antibióticos de los que se sabe tienen actividad anti-FPLO, habitualmente requieren un nivel de dosis demasiado próximo al nivel tóxico para ser de valor práctico. Se incluyen en este grupo la neomicina, canamicina y el cloramfenicol.

Muchos otros antibióticos antibacterianos que se usan para otras infecciones han demostrado no tener ningún efecto sobre los FPLO. Entre los ejemplos de estos últimos se incluye la penicilina y sus muchos derivados, la cicloserina, la novobiocina y muchos otros. Como puede verse, este grupo incluye agentes con un amplio espectro de actividad, de aquí que su inactividad contra el Mycoplasma muestra como estos microbios son un tipo único y especializado de bacteria.

Es una finalidad de la presente invención proveer

substancias antibióticas útiles que son altamente efectivas para dominar el agente etiológico primario de la enfermedad respiratoria crónica de los pollos y la sinusitis infecciosa de los pavos.

5

Una finalidad adicional de la presente invención es producir una substancia antibiótica nueva y útil que puede utilizarse en concentraciones más altas que las actualmente utilizables sin peligros resultantes de toxicidad.

10

Otra finalidad de la presente invención es proveer un antibiótico que tiene una absorción oral aceptable para tratar la enfermedad respiratoria crónica de los pollos y la sinusitis infecciosa de los pavos.

15

Una finalidad ulterior de la presente invención es proveer un antibiótico que puede aplicarse en dosis relativamente bajas en el tratamiento de la enfermedad respiratoria de los pollos y la sinusitis infecciosa de los pavos.

20

Otra finalidad adicional de la presente invención es proveer un antibiótico que es un agente activo contra una amplia gama de cepas de micoplasmas, incluso las que pertenecen a las especies M. gallisepticum (PPLO), en el tratamiento de la enfermedad respiratoria crónica de los pollos y la sinusitis infecciosa de los pavos.

25

Es aún una finalidad ulterior de la presente invención, proveer un procedimiento para preparar esta sustancia antibiótica novedosa.

Otras finalidades adicionales de la presente invención resultarán evidentes para los conocedores por la lectura de la siguiente memoria.

30

Las nuevas sustancias antibióticas de la presente invención se encuentran haciendo crecer, en condiciones con-

troladas, una especie previamente desconocida de microorganismos. El microorganismo se aisló del caldo de fermentación de un actinomiceto del suelo obtenido en Canadá. Este nuevo microorganismo ha sido designado Streptomyces canadensis MA-959 en la colección de cultivos de Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey. Un cultivo de este ha sido depositado en la sección de fermentación de la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, y se agregó a su colección permanente de cultivos como ATCC 17776.

Las características morfológicas y culturales del Streptomyces canadensis MA-959 se determinan a continuación:

STREPTOMYCES CANADENSIS MA-959

Morfología, Biverticilado. Cadenas rectas de 8-10 esporos, unas pocas cadenas más largas. Esporos cilíndricos (950 X tamaño medio 1,0 μ X 1,7 μ).

Czapek Dox Agar (Sacarosa - Nitrato): desarrollo leve. Micelio aéreo escaso, blanco. Desarrollo vegetativo incoloro. Reverse incoloro. No presenta pigmento soluble. Esporulación buena.

Glicerol-Asparagina-agar: Desarrollo bueno. Micelio aéreo medio, gris. Desarrollo vegetativo pardo o pardo rojizo. Reverse pardo o pardo rojizo. Pigmento soluble pardo o pardo rojizo (rosado en las primeras etapas del desarrollo una semana). No se observa esporulación.

Pasta de tomate-harina de avena-agar: Desarrollo bueno. Micelio aéreo bueno, gris con penachos blancos y exudado rosado, que aparece después de tres semanas. Desarrollo vegetativo pardo. Reverse pardo oscuro. Pigmento soluble pardo. Se observa alguna esporulación.

Agar de Emerson's: Desarrollo moderado. Micelio aéreo escaso, gris claro. Desarrollo vegetativo pardo. Reverse pardo. Pig-

- mento soluble pardo claro (rosado en las primeras etapas).
- Patata: Desarrollo bueno. Colonias lisas color crema o pardo grisáceo. Micelio aéreo gris claro (aparece solo en la porción más seca de la patata). Pigmento soluble medio, pardo
- 5 (rosado en las primeras etapas).
- Almidón-agar: Desarrollo bueno. No se observa micelio aéreo. Desarrollo vegetativo pardo claro. Reverse pardo claro. Pigmento soluble pardo claro (rosado en las primeras etapas del crecimiento). Hidrólisis.
- 10 Placa de gelatina nutritiva: Desarrollo bueno. No se observa micelio aéreo. Desarrollo vegetativo pardo claro. Reverse pardo claro. Pigmento soluble pardo claro. Licuación.
- Gelatina punzada: Pigmento soluble pardo verdoso oscuro. Licuación.
- 15 Maleato de calcio-agar: Desarrollo bueno. Micelio aéreo escaso, blanco rosado. Desarrollo vegetativo pardo amarillento. Ligero pardeo del medio a lo largo de la línea de crecimiento.
- Tirosina-agar: Desarrollo moderado. Micelio aéreo blanco rosado pálido. Desarrollo vegetativo pardo muy claro. Ligero pardeo del medio.
- 20 Peptona-hierro- Extrato de levadura inclinada: Desarrollo bueno. No se observa micelio aéreo. Desarrollo vegetativo gris. Pigmento soluble negro azulado a los dos días. Medio pardo a las tres semanas.
- 25 Leche descremada-agar: Desarrollo bueno. Micelio aéreo blanco rosado. Desarrollo vegetativo pardo claro. Pigmento soluble pardo muy claro. No se observa hidrólisis.
- Reducción de nitratos: Negativa en las condiciones del ensayo en medios orgánicos y sintéticos.
- 30 Temperatura: Desarrollo bueno a 28°C. No se observa desarrollo

a 50°C.

Desarrollo micro-aerófilo (extracto de levadura-dextrosa punzada): Gran desarrollo superficial y a lo largo de 2/3 de la línea de punzión.

5 Leche: Peptonización completa a las tres semanas. No se observa coagulación. Grueso anillo de desarrollo pardo con micelio aéreo disperso (gris claro). Pigmento soluble en el medio, pardo grisáceo. Reacción alcalina (pH: 7,9).

10 Leche tornasolada: Peptonización completa en tres semanas. No se observa coagulación. Reacción alcalina.

La precedente descripción del microorganismo productor de la ametobotromicina se da como ilustrativa de las cepas adecuadas de Streptomyces que pueden usarse en la producción de ametobotromicina, pero debe entenderse que la información
15 dada no debe limitarse a los organismos que responden a esta particular descripción. La presente invención también contempla el uso de otras especies de Streptomyces o mutantes de los organismos descriptos tales como los obtenidos por selección natural o los producidos por agentes mutantes, por ejemplo, irradiación con rayos X, irradiación ultra-violeta, mos-
20 tazas de nitrógeno y similares.

El nuevo antibiótico de la presente invención es un compuesto básico que forma sales con los ácidos, tanto inorgánicos como orgánicos, tales como el ácido clorhídrico, tartá-
25 rico, salicílico, etc., y otros compuestos. La forma de base libre de la ametobotromicina posee las siguientes propiedades físicas y químicas:

a. Tiene un punto de fusión comprendido en el intervalo de alrededor de 154° a 163°C.

30 b. Es fácilmente soluble en alcoholes, ésteres, éteres, di-

26-11-74

330520

solventes clorados y benceno.

- c. Es parcialmente soluble en agua.
- d. Es insoluble en éter de petróleo, hexano y similares.
- e. Tiene una rotación específica de $[\alpha]_D^{20} = -25^\circ$ en una disolución al 5% en etanol al 95%.

Desgraciadamente, en contraste con otros antibióticos, la ametobotromicina es un compuesto excesivamente complejo, que tiene un peso molecular de alrededor de 800. En consecuencia, hasta ahora no ha sido posible determinar la composición completa exacta de la ametobotromicina. Se ha encontrado que esta composición contiene los elementos carbono, hidrógeno, nitrógeno, azufre y oxígeno. Los porcentajes hallados de estos elementos son siguientes:

C -	58,40 %
H -	7,44 %
N -	13,42 %
S -	4,77 %
O -	15,97 % (por diferencia)
Total -	100,00 %

Estos datos sugieren una estructura molecular: $C_{40}H_{60}N_8O_7S_4$, pero son posibles también otras fórmulas moleculares similares dentro del error experimental de estas determinaciones.

El espectro de absorción infrarrojo del antibiótico ametobotromicina en cloroformo usando prismas de cloruro de sodio, se ilustra en el dibujo que se acompaña. Los picos característicos más significativos ocurren a las siguientes longitudes de onda expresadas en inversas de centímetros: 3290, 2980, 1739, 1640-1685, 1500, 1440, 1378, 1240, 1181, 1122, 1092, 1061, 995, 980.

Las lecturas de espectro infrarrojo precedentes pue-



den verse más fácilmente en los dibujos anexos. Por hidrólisis ácida, la ametobotromicina produce 6 sustancias ninhidrina-positiva, una de las cuales es la prolina.

5 La ametobotromicina posee el siguiente valor característico R_f en la combinación de disolventes indicada.

	R_f
Alcohol caprílico: fosfato tampon de pH 6	
(fase inversa)	0,30

10 (En este caso el papel fue impregnado con la fase estacionaria).

15 Las características del antibiótico de la presente invención pueden también incluir la cromatografía en capa delgada. Se toman placas cromatográficas en capa delgada que contienen sal de sílice y se desarrollan con cloroformo al 94% y metanol al 6%, se secan y se colocan en una cámara que contiene vapor de iodo. Una mancha parda indica la presencia del antibiótico de la presente invención, ametobotromicina. El R_f de esta zona es 0,60.

20 El cultivo que produce la ametobotromicina produce generalmente dos tipos de sustancias: un antibiótico de tipo netropsina y un antibiótico de tipo botromicina. El grupo botromicina de antibióticos de los que la ametobotromicina se extrae, se separa fácilmente del grupo netropsina por extracción con cloroformo de disoluciones acuosas. El extracto cloro-
25 fórmico, después de purificación, muestra la presencia de cinco sustancias antibióticas por bioautograma de cintas de papel. La cinta de papel utilizada para este ensayo consiste en papel impregnado con alcohol caprílico y revelado, aguas abajo con tampón, donde el R_f de la ametobotromicina es 0,30.
30 Los cinco componentes han sido designados componentes AaE en

26.11.74

orden de polaridad decreciente. La tabla A siguiente indica la bioactividad de todos los componentes de la botromicina. La primera columna "Staph. MIC" es un ensayo en tubo de dilución que mide la concentración inhibitoria mínima del antibiótico en un cultivo de caldo del microorganismo en ensayo, Staphylococcus aureus. La segunda columna "In Ova ED₅₀" es un ensayo in ova que mide el nivel de dosis efectiva del antibiótico en la protección de huevos embrionados contra una inyección conocida de microorganismo, en este caso, Mycoplasma Gallisepticum (PPIO). Este ensayo está tomado de la combinación de ensayos descrita por R. Yamamoto y H. E. Adlcr (Am. J. Vet. Res., julio, 1965) excepto que el parámetro usado para medir la efectividad de la droga fue la protección contra la mortalidad en lugar de la prolongación de la vida del embrión.

TABLA A

<u>Componente</u>	<u>Staph MIC µg/ml</u>	<u>In Ova ED₅₀ µg/huevo</u>
A	3,0	720
B	0,23	13
(Ametobotromicina)		
C	0,04	5
(Metobotromicina)		
D	0,16	10
E	0,23	5

La tabla B muestra que se liberan sustancias productoras de ninhidrina de los cinco componentes por hidrólisis ácida y cromatografía sobre papel.

Sigue tabla B.

330520

TABLA B

Ingrediente	A	(Ametobotromicina)	(metobotromicina)	D-E°
		B	C	
glicina	+	+	+	+
prolina	+	+	-	+
tiazol	+	+	+	+
metil prolina	-	-	+	+
valina	+	+	+	+
desconocido A	+	+	+	+
desconocido B	+			
β -metil fenilalanina	+	+	+	+

° Porcentaje presente demasiado pequeño para separar.

Como puede verse en la tabla B, la ametobotromicina contiene prolina, no contiene metil prolina ni contiene desconocido B.

En una disolución acuosa a un pH mayor que 10, el antibiótico es inestable. Sin embargo, a un pH de 3 a 9 el producto es estable durante 24 horas a temperatura ambiente.

La metobotromicina es activa en la inhibición de microorganismos gram positivos primariamente, aunque exhibe actividad contra microorganismos gram negativos.

El nuevo antibiótico de la presente invención se produce por la fermentación aeróbica de Streptomyces canadensis MA-959 en un medio acuoso adecuado. Los medios acuosos tales como los empleados para la producción de otros antibióticos son adecuados para la producción de ametobotromicina. Tales medios contienen fuentes de carbono y nitrógeno asimilables por el microorganismo, y sales inorgánicas. Además, los medios de fermentación contienen trazas de metales necesarias para el



crecimiento del microorganismo que están habitualmente presentes en fuentes complejas de carbono y nitrógeno en el medio.

En general, los hidratos de carbono tales como azúcares, por ejemplo, dextrosa, sacarosa, dextrina y similares, son fuentes adecuadas de carbono asimilable. La cantidad exacta de la fuente de carbón dependerá, en parte, de los otros ingredientes del medio, pero se ha encontrado habitualmente que una cantidad de hidrato de carbono comprendida aproximadamente entre 1% y 6% en peso con respecto al medio, es satisfactoria. Estas fuentes de carbono pueden usarse individualmente o pueden combinarse varias de dichas fuentes en el medio.

Varias fuentes de nitrógeno tales como hidrolizados de caseína, amino ácidos, por ejemplo, asparagina, glicina, arginina, digeridos de harina de soya, harina de soya, y similares son fácilmente asimilados por los microorganismos productores de ametobotromicina y pueden usarse en medios de fermentación para la producción de este antibiótico. En general, hemos encontrado que algunas fuentes orgánicas de nitrógeno, particularmente harina de soya, son muy satisfactorias para la producción del nuevo antibiótico. Las diversas fuentes inorgánicas y orgánicas de nitrógeno pueden utilizarse ya sean solas o en combinación en cantidades que van desde alrededor de 0,2% hasta alrededor de 6% en peso con respecto al medio acuoso.

El siguiente ejemplo ilustra un método para preparar el antibiótico de la presente invención, pero debe entenderse que se da con propósitos de ilustración y no de limitación.

EJEMPLO 1

A. Fermentación

Se preparó un medio que contenía 1% de dextrosa, 0,3%

de extracto de carne, 1,0% de digerido triptico de cafeina y 0,5% de cloruro de sodio con agua y se ajustó el pH a 7,0 con hidróxido de sodio esterilizado y agregado asépticamente a un cultivo inclinado de Streptomyces canadensis MA-959 (ATCC 17776) y los esporos fueron puestos en suspensión. Alrededor de 3 ml de esta suspensión de esporos se agregó asépticamente a un Erlenmeyer de 2 l. con tapón, que contenía 500 ml de medio acuoso estéril que consistía en 1% de dextrosa, 0,3% de extracto de carne, 1,0% de digerido triptico de cafeina y 0,5% de cloruro de sodio y el pH se ajustó nuevamente a 7,0. El frasco se incubó a 28°C sobre un agitador rotatorio a una velocidad de 120 rpm con un desplazamiento de 5 cm durante un período de 48 horas.

Este cultivo vegetativo se agregó entonces asépticamente a un fermentador de acero inoxidable de 190 l que contenía alrededor de 110 a 150 l, de medio estéril, con una composición que comprendía 1,5% de autolisado de levadura, 1% de dextrosa, 0,25% de cloruro de sodio, con el pH ajustado a 7,5. El medio inoculado se incubó a 28°C durante 40 h durante cuyo tiempo se agitó con aire estéril así, haciéndolo pasar a través del medio a una velocidad de 85 dm³ por min. Alrededor de 8,4% de este cultivo vegetativo se empleó para inocular un fermentador de acero inoxidable de 568 l que contenía alrededor de 450 l de un medio de una composición que comprendía 1,5% de autolisado de levadura, 0,5% de cloruro de sodio y 3% de dextrosa, a un pH de 7,0, previamente esterilizado con vapor a alrededor de 120°C durante 15 min. El cultivo se incubó a 28°C con agitación y aereación a una velocidad de 280 dm³/m hasta que se obtuvo el máximo rendimiento de antibiótico.

B. Recuperación

El antibiótico de la presente invención se recuperó del caldo de fermentación ajustando el pH del caldo a 4,8 con ácido clorhídrico y filtrando. El caldo filtrado se pasó a través de una resina Dowex 50 X 2 de sodio (19 litros) a una velocidad de 1,9 l por min. La resina se lavó con 38 l de agua y se levigó con 190 l de metanol al 70%, amoniaco 1,N 30%, a una velocidad de 0,9 l por min. Se tomaron 10 porciones de 19 l. y cada una se neutralizó a un pH de 7 con ácido clorhídrico al 5%. Se ensayaron las porciones y las porciones activas se evaporaron a un volumen de 28 l de agua. El concentrado se ajustó a un pH de 8 y se extrajo 3 veces con un volumen igual de cloroformo y los extractos se secaron sobre sulfato de sodio. El cloroformo enriquecido se pasó por una columna que contenía una mezcla de Florisil 70%, Celite 545, 30%, con un tiempo de contacto de 10 min. La absorción fue seguida por un lavado con 38 l de cloroformo, siguiéndose luego por una levigación con cloroformo-acetona 50%, a la misma velocidad. Se tomaron porciones de 1,9 l de levigado y se ensayaron las porciones. Las porciones activas se combinaron y se evaporaron a 1,9 l de cloroformo. El concentrado clorofórmico se secó en un plato y se recogió con unos 160 ml de metanol. Se agregaron 10 volúmenes de éter etílico y se filtraron los insolubles. Se agregó una disolución 10 a 1 de metanol-ácido clorhídrico concentrado, al filtrado etéreo, con agitación hasta que no se produjo más precipitación. El precipitado se filtró, se lavó con éter y se secó.

La ametobotromicina de la presente invención se aisló por cromatografía de partición con fosfato tampon 0,1 M pH 6,0, como disolvente de revelado. El Celite impregnado con alcohol caprílico se usa como fase estacionaria. La fase esta-

26.11.74

cionaria se prepara impregnando 113 kg de Celite lavado con ácido (tierra de diatomeas) con una disolución de 23 l de alcohol caprílico y 90 l de acetona. El Celite se seca al aire para eliminar la acetona y se compacta en una columna satisfactoria en capas delgadas y apisonando la uniformidad. Después de compactada la columna se lava con un fosfato tampón 0,1 M, pH 6,0 hasta que emergió medio volumen de tampón. Alrededor de 40 g de clorhidrato bruto descrito precedentemente se disuelve en 30 l de tampón de pH 6,0 y se coloca en la columna. La columna se reveló con un tampón de pH 6,0, tomando porciones de 19 l. Cada fracción se ensayó y se examinó por cromatografía sobre papel. Las fracciones ricas se concentraron a alrededor de 1/5 de su volumen, se ajustó el pH a 8,5 y se extrajeron dos veces con un volumen igual de cloroformo. Las disoluciones clorofórmicas se evaporaron a sequedad. Los residuos sólidos se disolvieron en una pequeña cantidad de metanol (alrededor de 500 ml) y se diluyeron con 20 volúmenes de éter etílico y se filtraron. A este filtrado se agregó ácido clorhídrico metanólico 1,2 N hasta que una posterior adición no produjo mas precipitaciones.

El clorhidrato del antibiótico se recogió y se secó in vacuo con los siguientes resultados:

<u>Antibiótico</u>	<u>Fracción</u>	<u>Cantidad</u>
Ametobotromicina	29-38	4,1 g.

La ametobotromicina y sus sales son valiosos agentes antibacterianos, que, como ha sido puntualizado precedentemente, son activos en la inhibición del crecimiento de varios organismos gram-positivos. Sin embargo, estos antibióticos son extremadamente útiles en el tratamiento de la enfermedad respiratoria crónica de los pollos y de la sinusitis infecciosa

06-11-74

de los pavos. En esta realización de la presente invención, se ha encontrado que la enfermedad respiratoria crónica de los pollos y la sinusitis infecciosa de los pavos puede inhibirse efectivamente del uso de la ametobotromicina o sus sales, que pueden ser administradas ya sea por vía subcutánea o por vía oral. Además, se ha encontrado que la ametobotromicina y sus sales son efectivas para dominar la enfermedad respiratoria crónica de los pollos y la sinusitis infecciosa de los pavos cuando se administra en dosis que varían desde alrededor de por lo menos 10 mg/kg hasta alrededor de 500 mg/kg de peso del cuerpo del ave sin el peligro resultante de toxicidad y, preferiblemente, de 10 mg/kg a 250 mg/kg de peso del cuerpo de las aves, lo que depende de la vía de administración.

Para ilustrar la actividad y las ventajas de la presente invención en la utilización de la ametobotromicina como antibiótico contra la enfermedad crónica respiratoria de los pollos y la sinusitis infecciosa de los pavos, se dan los siguientes ensayos. Se entiende, sin embargo, que se dan simplemente con propósitos de ilustración y de ninguna manera deben tomarse como limitando la invención.

ENSAYO I

Actividad de la ametobotromicina contra *Mycoplasma gallisepticum* en pollos

Se infectaron grupos de pollitos leghorn de 5 días de edad por vía saco-aéreo con un caldo de cultivo de *Mycoplasma gallisepticum*. Se suministró ametobotromicina en una disolución acuosa por vía subcutánea con dosis dadas a 2 h y a 18 h después de la infección. Se observaron las aves en cuanto al desarrollo de síntomas de la enfermedad respiratoria crónica y los resultados fueron los siguientes:

26-11-74

330520

<u>Dosis mg/kg X 2</u>		<u>Resultados a la terminación del ensayo</u>
	Testigos no tratados	Enfermedad evidente
	10	Enfermedad detenida
	25	Enfermedad detenida
5	50	Enfermedad detenida

Resulta evidente de los datos de los ensayos, que en los pollos tratados con por lo menos 10 mg/kg de ametobotromicina, se detuvo la infección producida por Mycoplasma gallisepticum, enfermedad respiratoria crónica infecciosa, mientras que en los pollos no tratados se desarrolló la infección de la enfermedad respiratoria crónica.

Debe naturalmente entenderse que las explicaciones teóricas para la posible fórmula y las proporciones de los ingredientes de ametobotromicina como se describe en la presente memoria, están basados en nuestro conocimiento actual de este producto y no excluye la posibilidad que datos experimentales posteriores establezcan que la fórmula postulada y las proporciones son, en verdad, incorrectas. De acuerdo con esto, no se desea estar limitado a estas consideraciones teóricas, aunque estas concuerden con los conocimientos actuales. Estas explicaciones se presentan principalmente como un medio para proveer un mejor conocimiento de la presente invención.

N O T A
-.-.-.-.-

Se reivindica como objeto de esta patente:

1.- Procedimiento para producir un antibiótico, y especialmente para la preparación de ametobotromicina, caracterizado porque comprende hacer desarrollar una cepa de Streptomyces productora de ametobotromicina en condiciones aeróbicas, en un medio nutritivo acuoso, hasta que se im-

parta a dicho medio una actividad antibiótica sustancial, y recuperar dicha ametobotromicina del caldo de fermentación.

2.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el microorganismo es Streptomyces ATCC 17776 o mutantes del mismo.

3.- Procedimiento para producir un antibiótico, y especialmente para la preparación de ametobotromicina, caracterizado porque comprende hacer desarrollar una cepa de Streptomyces productora de ametobotromicina, en condiciones aeróbicas, en un medio nutritivo acuoso que contenga fuentes asimilables de carbono y nitrógeno, y recuperar la ametobotromicina del caldo de fermentación.

4.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque el microorganismo es Streptomyces ATCC 17776 o mutantes del mismo.

5.- Procedimiento para producir un antibiótico, caracterizado porque comprende hacer desarrollar Streptomyces ATCC 17776, en condiciones aeróbicas, en un medio nutritivo que contenga harina de soya, dextrosa, solubles destiladores, autolisado de levadura y digerido triptico de cafeína, y recuperar la ametobotromicina del caldo de fermentación resultante.

6.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque el antibiótico se recupera por un procedimiento que comprende filtrar el caldo de fermentación acidificado, extraer el filtrado con un disolvente inmisible adecuado y recuperar la ametobotromicina de los extractos de disolventes y llevar a cabo la cromatografía partición para la separación de la ametobotromicina pura.

7.- Procedimiento para producir un antibiótico, el

cual, para recuperar la amfetobromicina de los caldos de fermentación, comprende la etapa caracterizada por acidificar un caldo de fermentación que contiene amfetobromicina a un pH de alrededor de 5,8, filtrar el caldo de fermentación acidificado, extraer el filtrado con un disolvente inmiscible y recuperar la amfetobromicina de los extractos de disolventes.

8.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque el disolvente es cloroformo.

10

9.- Procedimiento para producir un antibiótico.

Esta memoria consta de veinte y una hojas escritas por una sola cara.

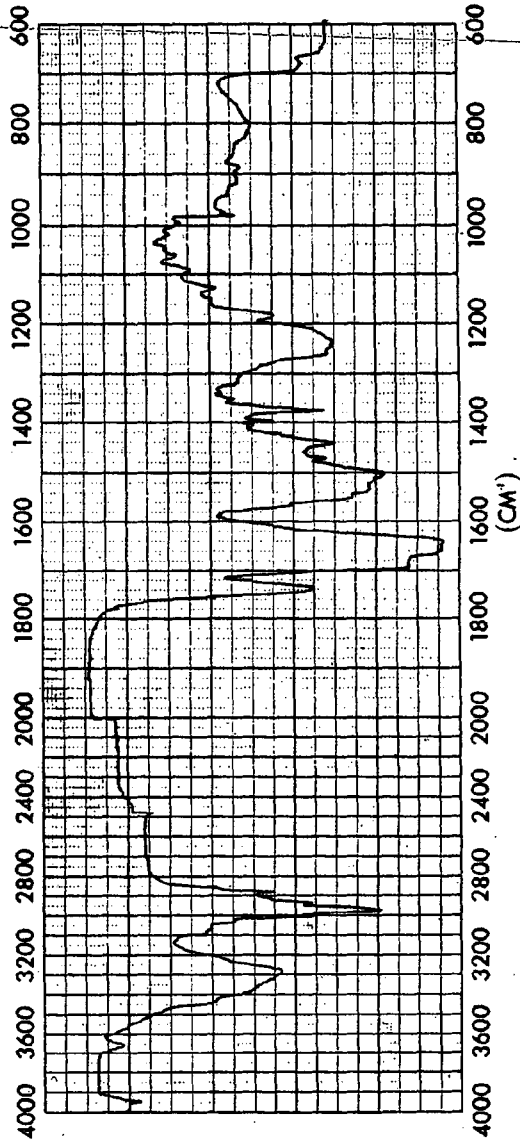
BARCELONA, 11 AGO. 1966

P. A.



330520

330520



[Handwritten signature]