

378552

PATENTE DE INVENCIÓN

Casa No. 22-530

SECCION TECNICA
CLASIFICACION U.P.C.
CLASE <u>E 12</u>
SUBCLASE <u>D</u>

14



Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL ANTIBIOTICO AM 374

Solicitante: AMERICAN GRANAMID COMPANY COMPANY, entidad estadounidense, residente en Berdan Avenue, Township of Wayne, Estado de New Jersey, EE. UU. de A.

La presente invención se relaciona con un nuevo antibiótico, con su producción por fermentación, con métodos para su recuperación y concentración a partir de soluciones crudas, con procedimientos para su purificación y con la preparación de sus sales.

5. La presente invención se relaciona también con un alimento mejorado para animales, particularmente para el uso con animales domésticos jóvenes, en los cuales se incluye aves de corral tales como pollitos, pavos, patos y similares. También es útil para ganado vacuno, caballos, cerdos, perros y ovejas jóvenes.

10. (168,024)
ECh

Se ha presentado un considerable problema para poder acelerar

POOR QUALITY

378552



- el crecimiento de animales domésticos jóvenes, y también para protegerlos contra enfermedades. La importancia económica de un régimen rápido de crecimiento es considerable, especialmente en animales domésticos de crecimiento rápido tales como aves de corral, por ejemplo pollos, pavos, patos y similares. Cuanto más rápido es el crecimiento, tanto mayor es la proporción de alimento que se transforma en carne. También es deseable impedir las enfermedades en los pollos. Para ambas finalidades se propuso anteriormente el uso de diversos antibióticos de espectro restringido, tales como penicilina, bacitracina, estreptomocina, y antibióticos de espectro amplios tales como tetraciclina, oxitetraciclina o clorotetraciclina, y similares. Cuando se los mezcla con alimentos para animales, en las cantidades apropiadas, estos compuestos alimentan en efecto la ganancia de peso bajo ciertas circunstancias, y las drogas facilitan también la protección contra infecciones. Sin embargo, siempre queda lugar para mejoras y es con un alimento mejorado de esta clase, para animales, con lo que se relaciona la presente invención.
- 5.
- 10.
- 15.

La presente invención comprende una composición de alimento para animales que contiene los ingredientes alimenticios convencionales nutritivamente equilibrados y una cantidad eficaz de antibiótico AM 374 como nuevo aditivo activador del crecimiento.

20.

La presente invención incluye en su alcance al antibiótico en formas diluidas, como concentrados crudos, y en formas cristalinas. Estos nuevos productos son activos contra una variedad de microorganismos que incluyen bacterias gram-positivas. Los efectos del

25.



nuevo antibiótico sobre micro-organismos específicos, juntamente con sus propiedades químicas y físicas, hacen que difiera de antibióticos anteriormente descriptos.

5. El nuevo antibiótico, al cual se ha denominado AM 374, se forma durante el cultivo, bajo condiciones controladas, de un nuevo estreptomiceto aislado a partir de un suelo que se encuentra en Utah, Estados Unidos de Norte América. Se ha depositado un cultivo viable del nuevo micro-organismo en el Culture Collection Laboratory, Northern Utilization Research and Development Division, United States Department of Agriculture, Peoria, Illinois, Estados Unidos de Norte América, y ha sido agregado a su colección permanente. Se encuentra libremente obtenible en este depósito bajo su Número de Registro NRRL 3582.

15. La descripción e identificación de este nuevo micro-organismo, que se mantiene en la colección de cultivos de Lederle Laboratories, Pearl River, Nueva York, EE.UU. de N.A., fueron suministradas por el Dr. H. D. Tresner de dichos laboratorios.

20. Se realizaron observaciones de las características de cultivo, fisiológicas y morfológicas del cultivo de acuerdo con los métodos detallados por Shirling y otros ("Methods for Characterization of Streptomyces Species", Internat. Journ. of Syst. Bacteriol. 16: 313-340, (1966)). Los medios utilizados en el estudio fueron elegidos entre los recomendados por Fridham y otros, ("A Selection of Media for Maintenance and Taxonomic Study of Streptomyces", Antibiotics Annual (1956-1957), pp. 947-953) para la cultivación de estrep-
- 25.



tomicetos. Los detalles están registrados en las Tablas I a IV, y más adelante se da una descripción general del cultivo. Los colores descriptivos subrayados fueron tomados de Jacobson y otros ("Color Harmony Manual" 3a. Ed. 1948).

5. Magnitud del crecimiento

Moderado sobre la mayoría de los medios; bueno sobre agar de dextrosa de patatas; leve sobre agar de solución de Czapek.

Micelio aéreo y/o color de los esporos en masa

10. Micelio aereo blanquizco sobre la mayoría de los medios; se vuelve Ivory (2 db) a Lt. Ivory (2 ca) en las áreas de esporulación.

Pigmentos solubles

15. Amarillento sobre diversos medios; ninguno sobre ágar de solución de Czapek, de asparagina-dextrosa y de sales inorgánicas-almidón.

Color del reverso

En tonos amarillentos sobre la mayoría de los medios.

Reacciones fisiológicas diversas

20. Los nitratos no se reducen a nitritos en caldo de nitrato orgánico; licuación completa de la gelatina en siete días; no se produce melanina sobre agar de peptona-hierro. Utilización de la fuente de carbono de acuerdo con el método de Pridham y otros, (J.Bact. 56: 107-114, (1948); utilización regular a buena de l-arabinosa, d-fructosa, i-inositol, lactosa, d-manitol, d-melibiosa, salicina,



d-trehalosa, d-xilosa; utilización pobre o nula de l-ramanosa, adonitol, d-melezitosa, d-rafinosa y sacarosa.

Micromorfología

5. Escaso micelio aéreo, que da lugar a cadenas enredadas largas y flexuosas de esporos elípticos a alargados, 0,5 a 0,6 μ x 1,0 a 1,3 μ . Superficie lisa del espora, de acuerdo con lo determinado mediante microscopía electrónica.

10. Sobre la base de las características generales observadas, los micro-organismos constituyen un miembro del género Streptomyces. Se realizó una comparación del cultivo NRRL 3582 con todos los especímenes de referencia disponibles de otros estreptomycetos que tienen características taxonómicas básicas similares. Dos especies tienen varias características en común con NRRL 3582; sin embargo, al examinar las descripciones de estas especies relacionadas, que existían en la literatura, se encontró ciertas diferencias básicas. 15. Estas diferencias se indican en la Tabla V. Además de estas diferencias, NRRL 3582 produce en general un crecimiento marcadamente más restringido sobre la mayoría de los medios y su esporulación tiende a ser más escasa.

20. En la Tabla V se puede observar que la morfología de los esporóforos de NRRL 3582 es la del tipo Rectus-Flexibilis de Pridham y otros (Appl. Microbiol. 6:52-79 (1958) mientras que la de las otras dos especies es Spira.

25. Esto constituye una diferencia muy fundamental, y por sí sola es apropiada para distinguir entre los organismos. Cuando se la

378552



considera juntamente con las otras diferencias indicadas, NRRL 3582 se destaca suficientemente de los demás para considerarlo como una especie separada.

5. Teniendo en cuenta el color marfil de los esporos producidos por el organismo, se propone la denominación Streptomyces eburnoporeus n.s. como epíteto descriptivo apropiado.

X

-1- 124

378552



378552

T A B L A I

ION DE SPECTIFICACIONES ERUCOSPOREUS n.s. MEXIL 3582

Incubacion: 14 dias
Temperatura: 28°C .

C A R A C T E R I S T I C A S D E C U L T I V A

Medio	Magnitud del crecimiento	Micelio aéreo y/o esporos	Pigmento soluble	Color del reverso	Observaciones
Agar de solución de Czapek	Leve	Micelio aéreo blancuzco, que se vuelve Ivory (2 db) a Ivory (2 ca) en zonas de esporulación. Esporulación leve	Nada	Lt. Melon Yellow (3 ea)	Crecimiento res-tringido
Agar de aspara-gina-Dextrosa	Moderada	Micelio aéreo blancuzco, escaso	Nada	Rambo (2 fb)	Crecimiento res-tringido; borde dentado de la colonia.
Agar de Hicker y Tresner	Moderada	Micelio aérea blancuzco que se vuelve Ivory (2 db) a Lt. Ivory (2 ca) en zonas de esporulación	Amarillen-to; leve	Lt. Amber (3 ic)	Crecimiento su-perficial papilar
Agar de ex-tracto de le-vadura	Moderada	Micelio aéreo blancuzco; vestigios de esporulación	Amarillen-to; leve	Lt. Amber (3 ic,)	Superficie rugosa

378552

T A E

CARACTERÍSTICAS DE CULTIVACION DE

<u>Medio</u>	<u>Magnitud del crecimiento</u>	<u>Mi</u>
Agar de solución de Czapek	Leve	Micelio se vuelve a <u>Ivery</u> esporul leve
Agar de asparagina-Dextrosa	Moderada	Micelio escaso
Agar de Hicker y Tresner	Moderada	Micelio se vuelve <u>Lt. Ivc</u> de espc
Agar de extracto de levadura	Moderada	Micelio vestigial



T A B L A I

CULTIVO DE STREPTOMYCES EBUROSPORIUS n.s. NRRL 3582

Incubacion: 14 días
Temperatura: 28°C .

Código del cultivo	Micelio aéreo y/o esporos	Pigmento soluble	Color del reverse	Observaciones
a	Micelio aéreo blanquecino, que se vuelve Ivory (2 db) a Ivory (2 ca) en zonas de esporulación. Esperulación leve	Nada	Lt. Melon Yellow (3 ea)	Crecimiento restringido
a	Micelio aéreo blanquecino, escaso	Nada	Bamboo (2 fb)	Crecimiento restringido; borda dentada de la colonia.
a	Micelio aérea blanquecino que se vuelve Ivory (2 db) a Lt. Ivory (2 ca) en zonas de esporulación	Amarillento; leve	Lt. Amber (3 ic)	Crecimiento superficial papilar
a	Micelio aéreo blanquecino; vestigios de esporulación	Amarillento; leve	Lt. Amber (3 ic.)	Superficie rugosa

378552

-8-124

378552



F. A. B. L. A. I (cont.)

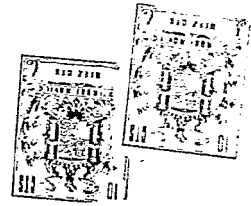
Medio	Magnitud del crecimiento	Micelio aéreo y/o esporos	Pigmento soluble	Color del reverso	Observaciones
Agar de copos de avena de Kuster	Moderada	Micelio aéreo blanqueco, que se vuelve Ivory (2 db) a Lt. Ivory (2 ca) en zonas de esporulación. Esporulación leve.	Castaño amarillento; leve	Lt. Melón y Lilox (3 ca)	Hidróclisis moderada del almidón
Agar de harina de avena y patata de tomate	Moderada	Micelio aéreo blanqueco, que se vuelve Ivory (2 db) a Lt. Ivory (2 ca) en zonas de esporulación. Esporulación leve.	Amarillo amarillado; moderado	Lt. Amber (3 ic)	Papilas superficiales
Agar de dextrinosa de patata	Buena	Micelio aéreo blanqueco, escaso. Se vuelve Ivory (2 db) a Lt. Ivory (2 ca) en zonas de esporulación. Esporulación leve.	Amarillo amarillado; moderado	Lt. Amber (3 ic)	Ive hidróclisis del almidón. Superficie de la colonia rugosa a cuarteada
Agar de Bennett	Moderada	Micelio aéreo blanqueco, escaso. Vestigios de esporulación	Amarillento; leve	Lt. Amber (3 ic)	Superficie arrugada y papilar.

378552

<u>Medio</u>	<u>Magnitud del crecimiento</u>	<u>F A B</u> <u>Micc</u>
Agar de copos de avena de Kuster	Moderada	Micelio aé que se ve Lt. Ivor as de esporulación l
Agar de harina de avena y pasta de tomate	Moderada	Micelio aé que se ve Lt. Ivor as de esporulaci
Agar de dextrosa de patata	Buena	Micelio aé escaso. Se (2 db) a l n zonas d esporulaci
Agar de Bennett	Moderada	Micelio aé escaso. Ve sporulación

- 8 - Bii

372552



T A B L A I (cont')

<u>Detalle</u>	<u>Micelio aéreo y/o esporos</u>	<u>Pigmento soluble</u>	<u>Color del reverso</u>	<u>Observaciones</u>
	Micelio aéreo blanquizco, que se vuelve Ivory (2 db) a Lt. Ivory (2 ca) en zonas de esporulación. Esporulación leve.	Castaño amarillento; leve	<u>Lt. Melon Yellow</u> (3 ca)	Hidrólisis moderada del almidón
	Micelio aéreo blanquizco, que se vuelve Ivory (2 db) a Lt. Ivory (2 ca) en zonas de esporulación. Esporulación leve.	Amarillo anaranjado; moderado	<u>Lt. Amber</u> (3 ic)	Papilas superficiales
	Micelio aéreo blanquizco, escaso. Se vuelve Ivory (2 db) a Lt. Ivory (2 ca) en zonas de esporulación. Esporulación leve.	Amarillo anaranjado; moderado	<u>Lt. Amber</u> (3 ic)	Leve hidrólisis del almidón. Superficie de la colonia rugosa a cuarteada
	Micelio aéreo blanquizco, escaso. Vestigios de esporulación	Amarillento; leve	<u>Lt. Amber</u> (3 ic)	Superficie arrugada y papilar.

378552

- 9- Bz

378552



T A B L A I (Cont')

<u>Medio</u>	<u>Magnitud del crecimiento</u>	<u>Micelio aéreo y/o esporos</u>	<u>Pigmento soluble</u>	<u>Color del reverso</u>	<u>Observaciones</u>
Agar de sales inorgánicas y almidón.	Moderada	Micelio aéreo blanco, que se vuelve Ivory (2 db) a Lt. Ivory (2 ca) en zonas de esporulación.	Nada	Lt. Melon Yellow (3 ea)	
		Esporulación leve			

378552

<u>Medio</u>	<u>Magnitud del crecimiento</u>	<u>A B</u> <u>Mic</u>
Agar de sales inorgánicas y almidón	Moderada	Mic cu ve <u>Lt.</u> zon ció Esp ve

- 9 - B₂

3-20-52



A B L A I (Cont')

<u>edad del micelio</u>	<u>Micelio aéreo y/o esporos</u>	<u>Pigmento soluble</u>	<u>Color del reverso</u>	<u>Observaciones</u>
ada	Micelio aéreo blan- cuzco, que se vuel- ve Ivory (2 db) a Lt. Ivory (2 ca) en zonas de esporula- ción. Esporulación le- ve	Nada	<u>Lt. Melon</u> <u>Yellow</u> (3 ea)	

-10- Bii

378552

378552



II

T A B L A

ENRUCOPOLIN D.S. NREL 3582

MICOMORFOLOGIA DE STREPTOMYCES

Forma de los esporos	Tamaño de los esporos	Superficie de los esporos
Elíptico o alargado	Esporos 0,5-0,6 μ x 1,0-1,3 μ	Lisa según se determina por microscopía electrónica

Medio Micelio aéreo y/o estructuras esporíferas

Agar de co-
pos de ave-
na de Kuster y flemosas de esporos

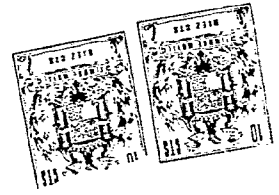
Micelio aéreo escaso que da lugar a cadenas enredadas largas

378552

T A B L A II

MICROMORFOLOGIA DE STREPTOMYCES EBURUSPO

<u>Medio</u>	<u>Micelio aéreo y/o estructuras esporíferas</u>	<u>Formas</u>
Agar de co- pos de ave- na de Kuster	Micelio aéreo escaso que da lu- gar a cadenas enredadas largas y flexuosas de esporas	Elípti- alarga



B L A II

FORMAS ESPOROFORMAS n.s. EERL 3582

Formas	Forma de los esporos	Tamaño de los esporos	Superficie de los esporos
de longitud largas	Elíptico o alargado	Esporos 0,5-0,6 μ x 1,0-1,3 μ .	Lisa según se determina por microscopía electrónica

-11- Aij

378552

378552



III

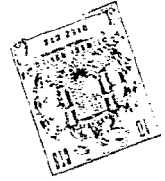
T A B L A

REACCIONES FISIOLOGICAS DIVERSAS DE ESTREPTOCOCCUS EPIDURICUS n. s. NRRL 3582

Medio	Periodo de Incubación	Magnitud del crecimiento	Temperatura: 28° C. Reacción fisiológica
Caldo de nitrato orgánico	7 días	Buena	Sin reducción de nitratos
Caldo de nitrato orgánico	14 días	Buena	Sin reducción de nitratos
Gelatina	7 días	Buena	Licuefacción completa
Agar de hierro	24 horas	Moderada	No se produce melanina

-11- Bis

378552



PLA III

SEPTIEMBRE ES EBURCSPOREUS n. s. NRRL 3582

Temperatura: 28° C.

<u>Reacción</u>	<u>Magnitud del crecimiento</u>	<u>Reacción fisiológica</u>
	Buena	Sin reducción de nitratos
	Buena	Sin reducción de nitratos
	Buena	Licuefacción completa
	Moderada	No se produce melarina

378552



TABLA IV

UTILIZACION DE LA FUENTE DE CARBONO DE STREPTOMYCES

EBUROSPOREUS n.s. NRRL 3582

Incubación: 10 días

Temperatura: 28°C.

5.	<u>Fuente de Carbono</u>	<u>Utilización</u>
	Adonitol	0
	l-Arabinosa	3
	d-Fructuosa	2
10.	i-Inositol	3
	Lactosa	3
	d-Manitol	3
	d-Melezitosa	0
	d-Melibiosa	3
15.	d-Rafinosa	0
	l-Ramnosa	1
	Salicina	3
	Sacarosa	0
	d-Trehalosa	3
20.	d-Xilosa	3
	Dextrosa	3
	Testigo negativo	0

3 - Buena utilización

2 - Utilización regular

1 - Utilización pobre

0 - Sin utilización

378552

-13- Bis



378552

T A B L A V.

COMPARACION DE STREPTOMYCES NRRL 3582, CON S. ALBIDOFLAVUS Y S. ODORIFER

	<u>Streptomyces NRRL</u>	<u>S. albidoflavus</u>	<u>S. odorifer</u>
Micelio aéreo y/o ramificaciones portadoras de esporos	Esporóforos largos, flexuosos y enredados	Esporóforos cortos, formando espirales	Esporóforos largos, rectos, ramificados; formando espirales
Forma del espore	Elípticas a alargada	Esférica	Esférica
Licuección de la gelatina	Licuección completa	Licuección rápida	Licuección lenta
Pigmentos solubles	Principalmente amarillos	Principalmente amarillos	Principalmente parduzcos
Crecimiento sobre agar de asparagina-dextrosa	Crecimiento amarillo; lento; micelio aéreo, blanquizco, escaso	Crecimiento castaño; micelio aéreo que se vuelve amarillo blanquizco	Crecimiento color crema a parduzco. Micelio aéreo abundante, color crema.

378552

T A B L A V

COMPARACION DE STREPTOMYCES NRRL 3582, CON S. ALB

	<u>Streptomyces NRRL</u>	<u>S.</u>
Micelio aéreo y/o ramificaciones portadoras de esporos	Esporóforos largos, filamentosos y enredados	Espóforos
Forma del esporo	Elípticas a alargada	Esfé
Licuasión de la gelatina	Licuasión completa	Licu
Pigmentos solubles	Principalmente amarillos	Prin rillo
Crecimiento sobre agar de asparagina-dextrosa	Crecimiento anari-llento; micelio aéreo, blanqueco, escaso	Crec- micel- vuel- cuze



A. V.

3582, GEN S. ALBIDOFLAVUS Y S. ODORIFER

MRRL	<u>S. albidoflavus</u>	<u>S. odorifer</u>
largos, enreda-	Esporóforos cortos, formando espirales	Esporóforos largos, rectos, ramificados; formando espirales
alargada	Esférica	Esférica
pleta	Licuaación rápida	Licuaación lenta
te ama-	Principalmente ama- rillentos	Principalmente par- duzcos
amari- lio aé- co; es-	Crecimiento castaño; micelio aéreo que se vuelve amarillo blan- cuzco	Crecimiento color crema a parduzco. Micelio aé- reo abundante, color crema.

378552



Se comprenderá que para la producción del nuevo antibiótico, la presente invención no se limita a este organismo particular o a organismos que responden plenamente al crecimiento expuesto más arriba y a las características microscópicas que han sido dadas con fines ilustrativos. En efecto, se desea y se tiene la intención de incluir el uso de mutantes producidos a partir del organismo descripto mediante diversos medios, tales como radiación X, radiación ultravioleta, mostaza nitrogenada, exposición a fago y similares.

Procedimiento de fermentación

- 10; La cultivación del organismo S. eburosporeus puede llevarse a cabo en una amplia variedad de medios líquidos de cultivo. Medios que son útiles para la producción del nuevo antibiótico incluyen una fuente asimilable de carbono tal como almidón, azúcar, melaza, glicerol, etc; una fuente asimilable de nitrógeno tal como proteína, hidrolizado de proteína, polipéptidos, aminoácidos, licor de maceración de maíz, etc.; y aniones y cationes inorgánicos, tales como potasio, sodio, calcio, sulfato, fosfato, cloruro, etc. Se suministra elementos vestigiales, tales como boro, molibdeno, cobre, etc., bajo la forma de impurezas u otros constituyentes de los medios. Se provee aereación en tanques y botellas forzando aire estéril a través de la superficie del medio de fermentación o sobre dicha superficie. Se provee agitación adicional en tanques mediante un impulsor mecánico. De acuerdo con lo necesario se puede agregar un agente antiespumante tal como 1% de octadecanol, en aceite de manteca de cerdo.
- 15.
- 20.

378552



Preparación del inoculum

Se prepara un inoculum de S. eburosporeus en frasco sacudidor, inoculando 100 ml. de medio líquido estéril, en frascos de 500 ml. con raspados o lavados de esporos de una placa inclinada de

5. agar del cultivo. Comúnmente se utiliza el siguiente medio.

- Melaza 20 g.
- Glucosa 10 g.
- Bactopeptona 5 g.
- Agua, c.s.p. 1000 ml.

10. A una temperatura de 25 a 29°C, y de preferencia 28°C, se incuba los frascos y se los agita vigorosamente sobre un sacudidor rotativo durante 30 a 48 hrs. Se utiliza estos inoculum de 100 ml. para inocular tandas de 1 y 12 lt. del mismo medio en fermentadores de vidrio de 2 y de 20 lt. Se aerea el amasijo de inoculum con aire

15. estéril mientras se continúa el crecimiento durante 30 a 48 hrs. Se utilizan esas tandas de inoculum para inocular fermentadores del tipo tanque.

Fermentación en tanque

20. Para la producción del antibiótico en fermentadores del tipo tanque, se utiliza de preferencia el siguiente medio de fermentación.

- Harina de soya 10 g.
- Cereposa 10 g.
- Cloruro de sodio 5 g.
- Carbonato de calcio 1 g.
- 25. Solubles de destilería de
maíz 5 g.
- Agua, c.s.p. 1000 ml.

378552



Se inocular cada tanque con 3 a 10% de inoculum producido en la manera descripta más arriba. Se suministra aereación a razón de 0,5 a 1,0 lt. de aire estéril por cada litro de caldo por minuto y se agita la mezcla de fermentación mediante un impulsor al cual se impulsa a razón de 200 a 400 r.p.m. Se mantiene la temperatura entre 25 y 29°C y por lo general a 28°C. Comúnmente se continúa la fermentación durante 65 a 90 hrs. en cuyo momento se cosecha el amasijo.

Procedimiento de purificación

10. Después de completar la fermentación, se filtra el amasijo fermentado que contiene el antibiótico de la presente invención, de preferencia a pH 6, para separar el micelio. Para facilitar la filtración se puede utilizar tierra de diatomeas o cualquier otro auxiliar convencional de filtración. Normalmente se lava con agua la torta micelial y se junta el lavado con el filtrado. Se adsorbe la actividad antibiótica sobre Darco G-60, u otro adsorbente tipo carbón apropiado, utilizando aproximadamente 0,5% (en peso/volumen) del adsorbente. Se puede eluir la actividad antibiótica, retenida sobre el carbón, agitando el carbón durante aproximadamente $\frac{1}{2}$ hr. con acetona acuosa al 40% ajustada a pH 2 mediante ácido sulfúrico concentrado, utilizando un volumen del eluato que es aproximadamente igual a un cuarto del volumen de cerveza original. Se concentra el eluato bajo presión reducida hasta una fase acuosa que es igual aproximadamente a un vigésimo de su volumen original. Se ajusta el pH de esta fase a aproximadamente 5,5 mediante hidróxido de bario y se separa por filtración el precipitado de sulfato de bario que se forma.
- 15.
- 20.
- 25.

378552



- Se concentra más todavía la solución ajustada (filtrado) hasta aproximadamente 400 a 600 ml. Con este concentrado se forma entonces una lechada con alúmina acidificada (utilizando aproximadamente un quinto de la cantidad de alúmina en gramos en comparación con el volumen del concentrado) y se vierte esta lechada sobre una columna apropiada de alúmina acidificada (utilizando aproximadamente 10 veces la cantidad de alúmina que se utiliza en la carga) compactada en húmedo en metanol. Se eluye la actividad antibiótica a partir de la columna mediante metanol acuoso (por lo general 25 a 50%) y se recoge fracciones activas apropiadas. Se combina las fracciones activas y se las concentra hasta pequeño volumen (1 lt. o menos) bajo presión reducida. Se ajusta el pH de este concentrado aproximadamente hasta 6,0 a 6,5 mediante hidróxido de bario. También en este caso se separa por filtración el precipitado de sulfato de bario que se forma y se liofiliza el filtrado claro de manera de obtener el antibiótico (crudo) AM 374. Se purifica más todavía el material liofilizado mediante cromatografía en columna sobre una resina intercambiadora de iones apropiada, por ejemplo CM Sephadex C-25 (forma H⁺). Se puede eluir la columna utilizando soluciones diluidas de ácido sulfúrico. Mediante hidróxido de bario, se ajusta aproximadamente a pH 6,3 el eluato que contiene la actividad antibiótica, situada por absorción a 280 m μ . Se separa por filtración el precipitado de sulfato de bario que se forma y se concentra el filtrado hasta un volumen de aproximadamente 30 a 80 ml. Se ajusta hasta aproximadamente 8,0 el pH de esta solución, mediante resina IR 45 (OH⁻). Se separa la resina por
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.

378552



filtración y se agrega el filtrado a una mayor cantidad de acetona con agitación y se recupera por filtración el precipitado que se forma. Se lava el precipitado con acetona y se le seca a temperatura moderada bajo presión reducida de manera de obtener el anti-
 5. biótico AM 374 en la forma de base.

Características físicas

Se puede preparar una mezcla microanalítica, precipitando base AM 374 en acetona metanólica y/o etanólica, y secando el precipitado bajo pronunciada presión reducida (10^{-3} mm) a 100°C. duran-
 10. te dos días. La base AM 374 antibiótica, preparada de esta manera, contiene los elementos carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y cloro, sustancialmente en los siguientes porcentajes en peso:

	Carbono	54,54
	Hidrógeno	6,10
15.	Oxígeno	29,01
	Nitrógeno	7,60
	Cloro	2,47

El material carece de un punto definido de fusión, descomponiéndose lentamente por encima de 250°C. La rotación óptica es
 20. $[\alpha]_D^{25} = 102 (\pm 2,9^\circ) C = 1,045$ en agua).

Se producen máximos de ultravioleta a:

- 282 μ (E $\frac{1\%}{1}$ cm. = 42) en soluciones ácidas;
- 282 μ (E $\frac{1\%}{1}$ cm. = 42,5) en soluciones neutras;
- 305 μ (E $\frac{1\%}{1}$ cm. = 51,5) en soluciones básicas;
- 25. esc.260 μ (E $\frac{1\%}{1}$ cm. = 92) en soluciones básicas.



Un espectro de absorción de infrarrojos de base AM 374 en una pastilla de KBr, preparada en una manera normal, manifiesta una absorción característica a las siguientes longitudes de onda expresadas en micrones: 3,0; 3,45; 6,0; 6,20; 6,30; 6,67; 6,88; 7,05; 7,22; 7,35esc; 7,52; 7,67; 8,2; 8,65esc; 8,85; 9,45; 9,75; 9,90; 10,45esc; 11,07; 11,5; 12,0; 12,35; 13,35; 14,4.

La curva infrarroja está ilustrada en la figura 1 del dibujo que se acompaña.

El antibiótico AM 374 muestra los siguientes valores de R_f en los sistemas solventes indicados más adelante utilizando Bacillus subtilis pH 6,0 ó Corynebacterium xerosis como organismos de detección:

Valor R_f	Sistema Solvente
0,90	NH ₄ Cl acuoso al 5%
0,20	Piridina 2 partes s-colidina 2 partes sec-butanol 1 parte agua 1 parte

La base antibiótica AM 374 es fácilmente soluble en agua y sulfóxido de dimetilo, y moderadamente soluble en metanol, y en menor medida en etanol.

El antibiótico AM 374 se distingue claramente de otros antibióticos por los datos de caracterización indicados más arriba y por su actividad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana in vitro de este nuevo antibiótico y de su producto de hidrólisis, está presentada en la siguiente Tabla VI que muestra la mínima concentración inhibidora que se requiere para impedir el crecimiento de

378552



micro-organismos representativos en un medio nutritivo.

TABLA VI

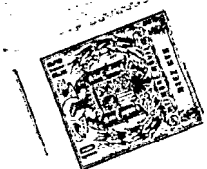
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DEL ANTIBIOTICO AM 374 Y SUS PRODUCTOS DE HIDROLISIS (*)

	Concentraciones inhibidoras mínimas (microgramos por ml.)	
	<u>Antibiótico</u> <u>AM 374</u>	<u>Producto</u> <u>hidrólisis</u>
<u>Staphylococcus aureus,</u> ATCC 6538P	3,1	6,2
<u>Staphylococcus aureus,</u> No. 69	3,1	3,1
<u>Staphylococcus aureus,</u> Rose ATCC 15154	6,2	6,2
<u>Staphylococcus aureus,</u> Smith ATCC 13709	6,2	6,2
<u>Streptococcus pyogenes</u> C 203	0,62	1,25
<u>Streptococcus faecalis</u> ATCC 8043	3,1	6,2
<u>Streptococcus sp., no hemo-</u> <u>lítico No. 11</u>	6,2	6,2
<u>Streptococcus sp., β-hemo-</u> <u>lítico No. 80</u>	6,2	6,2
<u>Mycobacterium smegmatis</u> ATCC 607	∇ 250	125
<u>Salmonella typhosa</u> ATCC 6539	∇ 250	∇ 250
<u>Proteus vulgaris</u> ATCC 9484	∇ 250	∇ 250
<u>Escherichia coli</u> U 311	∇ 250	∇ 250
<u>Escherichia coli</u> DY	∇ 250	∇ 250
<u>Klebsiella pneumoniae</u> Strain AD	∇ 250	∇ 250

* utilizando el método de dilución con agar.

73

378552



<u>Enterobacter aerogenes</u>		
No. 75	> 250	> 250
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>		
ATCC 10145	> 250	> 250

El AM 374 es activo in vivo también contra una variedad de micro-organismos gram-positivos como estafilococos, neumococos y estreptococos. Por lo tanto, el nuevo antibiótico es potencialmente útil como agente terapéutico para tratar infecciones bacterianas en mamíferos causadas por micro-organismos de esta clase.

5.

Se puede esperar que el nuevo antibiótico es útilmente utilizable para tratar o controlar infecciones de esta clase mediante aplicación como tópico o por administración parenteral.

10.

La utilidad del nuevo antibiótico queda demostrada por su capacidad para controlar en el ratón las infecciones letales sistémicas. El nuevo antibiótico manifiesta alta actividad antibacteriana in vivo en los ratones contra Staphylococcus aureus, cepa Smith;

15.

Staphylococcus aureus, cepa Rose; Streptococcus pyogenes, C 203 y Diplococcus pneumoniae, SV 1 cuando se le administra en una sola dosis subcutánea a grupos de ratones hembra Carworth Farms CF-1, de un peso de aproximadamente 20 g., infectados intraperitonealmente con una dosis letal de estas bacterias 10^{-2} , 10^0 , 10^{-5} y 10^{-6} en diluciones TSP de caldo de soya y tripticasa, respectivamente, de un cultivo en sangre TSP.

20.

La siguiente Tabla VII ilustra la actividad antibacteriana in vivo del AM 374 mientras que la siguiente Tabla VIII ilustra la actividad antibacteriana en vivo del producto de hidrólisis.

378552



- 22 - Bth

378552

ACTIVIDAD ANTIBIOTICA EN VIVO DEL ANTIBIOTICO AM 374

Ratones vivos/total, 14 días después de la infección

Dosis mg/kg. de peso del cuerpo	Staphylococcus aureus Cepa Smith		Staphylococcus aureus Cepa Rose		Streptococcus pyogenes C 203		Diplococcus pneumoniae SVI	
	320	-	-	20/20	-	-	-	-
80	-	-	18/20	-	-	-	-	-
20	20/20	-	4/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
5	20/20	-	0/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
1,25	1/20	-	-	3/20	3/20	15/20	15/20	15/20
0,32	2/20	-	-	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20

De los ratones testigo no tratados infectados murieron 95-100% dentro de los 5 días después de la infección

378552

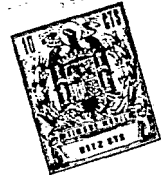
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VIVO DEL

Ratones vivos/total, 14 días después

Dosis mg/kg.de peso del cuerpo	Staphylococcus aureus Cepa Smith	Staph: a Cepa
320	-	20
80	-	18
20	20/20	4
5	20/20	0
1,25	1/20	
0,32	2/20	

De los ratones testigo no tratados infectados mur de la infección

- 22 - Bis



TERMINA IN VIVO DEL ANTIBIOTICO AM 374

total. 14 días después de la infección

<u>Staphylococcus aureus</u> <u>Smith</u>	<u>Staphylococcus aureus</u> <u>Cepa Rose</u>	<u>Streptococcus pyogenes</u> <u>C 203</u>	<u>Diplococcus pneumoniae</u> <u>SV1</u>
-	20/20	-	-
-	18/20	-	-
0/20	4/20	20/20	20/20
0/20	0/20	20/20	20/20
1/20	-	3/20	15/20
1/20	-	0/20	0/20

.....
Estados infectados murieron 95-100% dentro de los 5 días después de la infección

30-40-73

378552

TABLA VIII

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE AM 374 IN VIVO

PRODUCTO DE HIDROLISIS



<u>Dosis:</u> <u>mg/kg. de peso</u> <u>del cuerpo</u>	<u>Ratones vivos/Total</u> <u>14 días después de la</u> <u>infección</u> <u>Staphylococcus aureus</u> <u>Cepa Smith</u>
20	5/5
5	3/5
1,25	0/5
0,32	1/5
0,08	0/5

Se describirá mas en detalle la presente invención con referencia a los siguientes Ejemplos específicos.

EJEMPLO 1

Preparación del inoculum

5. Se prepara un medio típico, utilizado para el crecimiento del inoculum primario, de acuerdo con la siguiente fórmula:

- Melaza 20 g.
- Glucosa 10 g.
- Bactopeptona 5 g.
- 10. Agua, c.s.p. 1000 ml.

Se utiliza los esporos lavados o raspados, de una placa inclinada de agar de S. oburosporeus para inocular dos frascos cada uno de los cuales contiene 100 ml. del medio mencionado más arriba, en frascos de 500 ml. Se dispone los frascos sobre un sacudidor rotati-



vo y se los agita vigorosamente durante 28 hrs. a 28°C. Se transfiere el inoculum resultante del frasco a un fermentador de vidrio de 18,9 lt. que contiene 12 lt. de medio estéril. Se aerea el fermentador de vidrio con aire estéril mientras se lleva a cabo el crecimiento, durante aproximadamente 48 hrs., después de lo cual se utiliza los contenidos para sembrar un fermentador del tipo tanque de 300 lt.

5.

EJEMPLO 2

Permentación

10. Se prepara un medio de fermentación de acuerdo con la siguiente fórmula:

- Harina de soya 10 g.
- Cerecisa 10 g.
- Cloruro de sodio 5 g.
- Carbonato de calcio 1 g.
- Solubles de destilería de
maíz 5 g.
- Agua, c.s.p. 1000 ml.

15.

Se esteriliza a 120°C el medio de fermentación mediante vapor a una presión de 6,80 kg. durante 45 a 60 minutos. El pH del medio después de la esterilización es 6,6. Se inocular 300 lt. de medio estéril en un fermentador del tipo tanque de 400 lt. con 12 lt. de inoculum como el descrito en el Ejemplo 1, y se lleva a cabo la fermentación a 28°C utilizando aceite Hodag LG-8 como agente desespumante. Se suministra aereación a razón de 0,5 lt. de aire estéril.

20.



por cada litro de amasijo por minuto. Se agita el amasijo mediante un impulsor al cual se impulsa a razón de 300 r.p.m. Al término de aproximadamente 70 hrs. de tiempo de fermentación, se cosecha el amasijo.

5.

EJEMPLO 3

Aislación y purificación

- Se filtra 300 lt. de amasijo fermentado con aproximadamente 2% (p/v) de auxiliar de filtro de tierra de diatomeas y se lava la masa del filtro con aproximadamente 30 lt. de agua. Previamente se
10. ajusta el amasijo fermentado a pH a 6,0 mediante hidróxido de sodio. Se adsorbe la actividad antibiótica en el filtrado y el lavado de agua reunidos, sobre 900 g. de Darco G-60 y se separa las impurezas coloreadas de la suspensión de carbón, mediante agitación con aproximadamente 30 lt. de acetona acuosa al 40%. Se eluye la actividad
15. del carbón por agitación con 75 lt. de acetona acuosa al 40% ajustada a pH 2,0 mediante ácido sulfúrico concentrado. Se filtra la suspensión, se concentra el eluato bajo presión reducida hasta aproximadamente 4 lt. de fase acuosa y se ajusta el pH a 5,2 con hidróxido de bario. Se separa por filtración el precipitado de sulfato
20. de bario y se concentra más todavía el filtrado hasta aproximadamente 700 ml. Con este concentrado se forma una lechada en 100 g. de alúmina tratada con ácido y se vierte sobre una columna que consiste en 1 kg. de alúmina en metanol tratada con ácido. Se prepara la alúmina tratada con ácido, acidificando una lechada acuosa de alúmina Merck mediante ácido sulfúrico concentrado hasta que se obtie-
- 25.

378552



ne un pH constante de 3,0, se filtra, se lava con agua y metanol y seca al aire. Se eluye entonces la columna con 5 lt. de metanol seguido por 60 lt. de metanol acuoso al 50% seguido por 10 lt. de metanol acuoso al 25%. Se combina fracciones apropiadas que contienen antibiótico AM 374, según se determina mediante bioanálisis contra C. xerosis, y se las concentra bajo presión reducida hasta aproximadamente 500 ml. ajustándose el pH a 6,2 mediante hidróxido de bario. Se separa por filtración el precipitado de sulfato de bario y se liofiliza el filtrado de manera de obtener 5,1 g. de AM 374 crudo (pureza aproximadamente 30 a 50%).

Se disuelve 5,1 g. de AM 374 crudo, así obtenido, en 30 ml. de agua y se le aplica una columna de CM Sephadex C-25 (forma H⁺). Se separa el Sephadex (250 g.) para el uso, formando con el mismo una lechada en aproximadamente 3 lts. de agua y se ajusta el pH a 2,0 mediante H₂SO₄ concentrado. Se decanta el agua en exceso y se lava la resina varias veces con agua. Se vierte la lechada en una columna (7,6 cm. de D.I.) y se la lava con otros 5 lt. de agua para separar el ácido en exceso.

Se eluye la columna con un gradiente entre 4 lt. de agua y 4 lt. de agua ajustada a pH 1,4 mediante ácido sulfúrico concentrado, seguido por otros 4 lt. de agua ajustada a pH 1,4. Se recoge la fracción (aproximadamente 100 ml. cada una) y se mide la bioactividad (C. xerosis) y la absorbencia ultravioleta (280 mμ) en diluciones 1 a 100 de estas fracciones.

Se comprueba que las fracciones 58 a 80 contienen la mayor

378552



parte del antibiótico y se las combina en una sola masa. Se ajusta el pH de esta masa a 6,3 mediante hidróxido de bario y se separa por filtración el sulfato de bario precipitado con ayuda de tierra de diatomeas. Se concentra el filtrado aproximadamente a 200 ml. y se liofiliza, obteniéndose aproximadamente 1,5 g. de antibiótico crudo. Se disuelve el antibiótico crudo en 50 ml. de agua y se ajusta el pH de la solución aproximadamente a 8,2 mediante IR 45 (forma OH^-). Se filtra la suspensión y se liofiliza el filtrado. Se disuelve el liofilizado en 40 ml. de agua y el antibiótico se precipita por adición de 400 ml. de acetona. Se recoge por filtración el precipitado cristalino y se lo disuelve en una pequeña porción de metanol. La adición de acetona precipita el antibiótico purificado AM 374 al cual se recoge por filtración, obteniéndose 1,18 g.

Se prepara una muestra microanalítica por precipitación de AM 374, que se obtiene en la manera descrita más arriba, en acetona etanólica y secando el precipitado bajo pronunciada presión reducida (10^{-3} mm) a 100°C por dos días. El análisis químico de este producto y las otras propiedades físicas y biológicas del nuevo antibiótico ya fueron descriptos más arriba.

EJEMPLO 4

Conversión de base de AM 374 a sulfato de AM 374

Se disuelve 150 mg. de base de AM 374 en 60 ml. de metanol caliente al cual se agrega 1 gota de una solución 1:1 de metanol-ácido sulfúrico concentrado. Se filtra el precipitado resultante y se le lava con un poco de metanol y acetona de manera de obtener 98 mg.

378552



de sulfato de AM 374.

Se puede preparar también el sulfato de AM 374 ajustando una solución acuosa de base AM 374 hasta aproximadamente pH 6,3 mediante ácido sulfúrico, seguido por precipitación con acetona.

5. Se prepara una muestra microanalítica por precipitación en acetona acuosa y secando el precipitado bajo pronunciada presión reducida (10^{-3} mm) a 100°C durante 2(dos) días. El sulfato de AM 374 preparado en esta manera, contiene los elementos carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre y cloro sustancialmente en los siguientes porcentos en peso:
- 10.

Carbono	51,68
Hidrógeno	5,85
Oxígeno	30,25
Nitrógeno	7,02
Azufre	1,36
Cloro	2,27

15.

La rotación óptica es $[\alpha]_D^{25} = 104^\circ (\pm 2,8^\circ)$ (C=1,075 en agua).

Se producen máximos ultravioletas a:

- 282 m μ (E $\frac{1\%}{1}$ cm. = 44) en soluciones ácidas;
20. 282 m μ (E $\frac{1\%}{1}$ cm. = 43) en soluciones neutras;
- 305 m μ (E $\frac{1\%}{1}$ cm. = 48) en soluciones básicas;
- osc. 260 m μ (E $\frac{1\%}{1}$ cm. = 85) en soluciones básicas.

Un espectro de absorción infrarrojo de sulfato de AM 374 en una pastilla de KBr, que se prepara en una manera normal, manifiesta

378552



ta absorción característica en las siguientes longitudes de onda expresadas en micrones:

- 3,0; 3,45; 5,75esc; 5,90esc; 5,99; 6,03; 6,20; 6,32; 6,67;
- 6,78esc; 6,87; 7,05; 7,20; 7,53; 7,65; 8,25; 8,65esc; 8,87;
- 5. 9,45; 9,73; 9,88esc; 10,45esc; 11,05; 12,0; 12,35; 13,3;
- 14,4.

EJEMPLO 5

Conversión de base de AM 374 a cloruro de AM 374

10. So disuelve 200 mg. de base de AM 374 en 10 ml. de ácido clorhídrico 0,1N y se concentra aproximadamente hasta 2 ml. bajo presión reducida, con lo cual se forma un precipitado parcialmente microcristalino. Se le filtra, se redisuelve el precipitado en un mínimo de agua y se le reprecipita en acetona. Se filtra y se lava con un poco de acetona adicional para obtener 116 mg. de cloruro de AM 374.

15.

So prepara una mezcla microanalítica por precipitación en acetona acuosa y secando el precipitado bajo pronunciada presión reducida (10^{-3} mm) a 100°C durante 2 días. El cloruro de AM 374, preparado en esta manera contiene los elementos carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y cloro sustancialmente en los siguientes porcentajes en peso:

20.

25.	Carbono	52,20 g.
	Hidrógeno	6,22 g.
	Oxígeno	28,03 g.
	Nitrógeno	7,26 g.
	Cloro	6,34

378552



La rotación óptica es $[\alpha]_D^{25} = 106^\circ (\pm 2,8)$ (c = 1,057 en agua). Se producen máximas ultravioletas a:

- 282 m μ (E $\frac{1\%}{1 \text{ cm.}}$ = 42) en soluciones ácidas;
- 282 m μ (E $\frac{1\%}{1 \text{ cm.}}$ = 39,5) en soluciones neutras;
- 5. 305 m μ (E $\frac{1\%}{1 \text{ cm.}}$ = 52) en soluciones básicas;
- esc 260 m μ (E $\frac{1\%}{1 \text{ cm.}}$ = 92) en soluciones básicas.

El espectro de absorción de infrarrojos del cloruro de AM 374 en una pastilla de KBr, que se prepara en una manera normal, manifiesta absorción característica a las siguientes longitudes de onda expresadas en micrones: 3,0; 3,27; 3,40; 5,75esc; 5,90esc; 10. 5,98; 6,15; 6,28; 6,65; 6,82esc; 7,03; 7,15; 7,50; 7,65; 8,25; 8,60; 8,83; 9,42; 9,70; 9,88; 10,45esc; 11,05; 11,9; 12,3; 13,3; 14,37.

EJEMPLO 6

15. Producto de hidrólisis ácida de base de AM 374

Se disuelve 1 g. de base de antibiótico AM 374 en 7,5 ml. de agua hirviente. Se le agrega 1,25 ml. de ácido clorhídrico 5N y se hierve la solución resultante durante otros 2 a 3 minutos. Se agrega otros 2 ml. de ácido clorhídrico 5N y se enfría la solución. 20. Se la filtra y se lava el precipitado con un total de 3 ml. de ácido clorhídrico 5N. Se le redissuelve en agua y se le concentra hasta un residuo. Se repite esto dos veces más, después de lo cual se precipita el residuo en acetona acuosa de manera de obtener 516 mg. de producto de hidrólisis ácida.

378552



Se prepara una muestra microanalítica por precipitación en acetona acuosa y secando el precipitado bajo pronunciada presión reducida (10^{-3} mm) a 100°C durante dos días. El producto de la hidrólisis del AM 374, preparado en esta manera, contiene los elementos carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y cloro sustancialmente en los siguientes porcentajes en peso:

5.

Carbono	52,54
Hidrógeno	5,81
Oxígeno	25,52
Nitrógeno	8,32
Cloro	7,11

10;

La rotación óptica es $[\alpha]_D^{25} = -69^{\circ} (\pm 3,6^{\circ})$ ($C = 0,839$ en agua). Se producen máximas ultravioletas a:

15.

- 280 μ ($E_{1\text{ cm.}}^{1\%} = 46$) en soluciones ácidas;
- 280 μ ($E_{1\text{ cm.}}^{1\%} = 51,5$) en soluciones neutras;
- 300 μ ($E_{1\text{ cm.}}^{1\%} = 86$) en soluciones básicas;
- esc 260 μ ($E_{1\text{ cm.}}^{1\%} = 143$) en soluciones básicas.

20.

El espectro de absorción de infrarrojos del producto de la hidrólisis del AM 374 en una pastilla de KBr, que se prepara en una manera normal, manifiesta absorción característica a las siguientes longitudes de onda expresadas en micrones: 3,0; 3,30esc; 3,43; 5,75esc; 5,92esc; 6,0; 6,15esc; 6,25; 6,48esc; 6,68; 6,85; 7,03; 7,18; 7,5; 7,67; 7,95esc; 8,30; 8,55esc; 8,86; 9,15; 9,45; 9,9; 10,45esc; 11,1; 11,55esc; 11,9; 13,3; 14,4.

378552



EJEMPLO 7

Dieta basal para pollos

	<u>Ingrediente</u>	<u>g/kg.</u>
	Maíz amarillo molido	514
5.	Harina de aceite de soya (44%)	300
	Harina de gluten de maíz	50
	Harina de pescado Menhaden (60%)	50
	Grasa	40
	Harina de alfalfa deshidrata (17%)	20
10.	Piedra caliza molido	5
	Fosfato dicálcico	12
	Cloruro de sodio	3
	Minerales vestigiales (†)	1
	Premezcla de vitaminas(‡)	5
15.	†) Los minerales vestigiales son manganeso (6,0%), iodo (0,12%), hierro (2,0%), cobre (0,2%), zinc (2,0%), cobalto (0,02%), y calcio (25,5%).	
	‡) Premezcla de vitaminas, por kilogramo de alimento, que contiene 125 mg. de hidróxi tolueno butilado, 500 mg. de DL-metionina, 3300 U.I. de vitamina A, 1100 U.I. de vitamina D ₃ , 2,2 U.I. de vitamina E; 11 µg de vitamina B ₁₂ ; 4,4 mg. de riboflavina, 27,5 mg. de niacina, 8,8 mg. de ácido pantoténico; 500 mg. de cloruro de colina, 1,43 mg. de ácido fólico y 1,1 mg. de bisulfito sódico de menadiona por cada 5 g. de maíz amarillo molido.	
20.		

378552



Se aloja pollos de pocos días de edad (6 machos y 6 hembras por grupo) adquiridos a un proveedor comercial, en criadoras calentadas y se los tiene en un cuarto para pollos, al cual se mantiene aproximadamente a 24°C. Se pesan todos los grupos de pollos al comienzo de los ensayos y al término a los 20 días. Se suministra ad libitum alimento y agua. Para todos los ensayos se utiliza la dieta basal descripta más arriba.

Los tratamientos utilizados son (a) testigos no tratados; (b) 10 p.p.m. de AM 374; (c) 2 p.p.m. de AM 374.

En la siguiente Tabla IX se indican los datos obtenidos, pudiéndose ver que, a ambos niveles de tratamiento, el AM 374 manifiesta una marcada mejora en el crecimiento de las aves tratadas.

TABLA IX

CRECIMIENTO Y EFICACIA DE LA ALIMENTACION EN POLLOS QUE RECIBEN RACIONES QUE CONTIENE AM 374 H

<u>Aditivo del alimento</u>	<u>Nivel (p.p.m)</u>	<u>Exp. N^o</u>	<u>0-20 día ganancia</u>	<u>Alimentación / ganancia</u>	<u>Relación de supervivencia</u>	<u>%/ mejora Ganancia</u>	
							<u>A/G</u>
nada	-	A	266	1,70	29/30	-	-
AM 374 H	10	-	284	1,62	30/30	6,8	4,9
nada	-	B	288	1,75	39/40	-	-
AM 374 H	2	-	302	1,63	18/20	4,9	7,4

378552



EJEMPLO 8

COMPOSICION DE LA DIETA

	<u>Ingrediente</u>	<u>Concentración (%)</u>
	Maiz amarillo molido	51,4
5.	Harina de aceite de soya (44%)	30,0
	Harina de gluten de maíz	5,0
	Harina de pescado Menhaden (60%)	5,0
	Grasa (NRG-50)	4,0
	Harina de alfalfa deshidratada (17%)	2,0
10.	Piedra caliza molida (33% Ca)	0,5
	Fosfato dicálcico	1,2
	Cloruro de Sodio	0,3
	Minerales vestigiales (†)	0,1
	Premezcla de vitaminas (††)	0,5
15.	†) Linc Crest Z-2 Delamix que contiene 25,5% de calcio; 6,0% de manganeso, 2,0% de hierro, 2,0% de zinc, 0,12% de iodo y 0,02% de cobalto.	
20.	††) Provee 3300 UI. de vitamina A, 1100 U.I. de vitamina D ₃ ; 2,2 U. I. de vitamina E, 500 mg. de cloruro de colina, 500 mg. de DL-metionina, 125 mg. de etoxiquina, 27,5 mg. de niacina, 8,8 mg. de ácido pantoténico, 4,4 mg. de riboflavina, 1,43 mg. de ácido fólico, 1,1 mg. de menadiona, 0,011 mg. de vitamina B ₁₂ por kilogramo de alimento.	

378552

- J 5 - Bes

378552



T A B L A X

CRECIMIENTO Y EFICACIA DE LA ALIMENTACION EN FOLLOS QUE RECIBEN RACIONES QUE CONTIENEN DIVERSOS ADITIVOS

1	2	3	4	5	6	7	8
Aditivo del alimento	Nivel (p.p.m.)	Exp. No.	0-20 días Ganancia (g)	Alimento Ganancia	Relación de supervivencia	% mejora Ganancia	A/G
Nada	-	1599	266	1,70	29/30	-	-
Penicilina	200	-	315	1,50	28/30	18,4	13,3
Paizona	10	-	298	1,58	30/30	12,0	7,6
AM 374 H	10	-	284	1,62	30/30	6,8	4,9
AV 290D	10	-	282	1,59	28/30	6,0	6,9
Nada	-	1563	288	1,75	39/40	-	-
Penicilina	200	-	317	1,70	20/20	10,0	2,9
Paizona	10	-	289	1,75	20/20	0,3	0,0
AM 374 H	2	-	302	1,63	18/20	4,9	7,4
AV 290 D	2	-	312	1,70	20/20	8,3	2,9

Columna 4 $\sqrt{0-20}$ días; ganancia (g) $\sqrt{\quad}$ representa la ganancia total de peso a través del período de ensayo de 20 días.

Columna 5 (alimentación/ganancia) representa la relación entre gramos del alimento consumido y gramos de ganancia de peso al cuerpo.

Columna 7 $\sqrt{\quad}$ de mejora; (ganancia) $\sqrt{\quad}$ representa la mejora porcentual en la ganancia de peso, es decir $\sqrt{\frac{315}{266} \cdot 100} - 100 = 18,4$.

Columna 8 (% de mejora; F/G) representa la mejora porcentual de la relación entre gramos del alimento y gramos de ganancia de peso, es decir $\sqrt{\frac{1,7}{1,5} \cdot 100} = 13,3$.

378552

- 35 -

T A B L A X

CRECIMIENTO Y EFICACIA DE LA ALIMENTACION EN POL
QUE CONTIENEN DIVERSOS ADITIVOS

1	2	3	4	5
Aditivo del alimento	Nivel (ppm)	Exp. N ^o	0-20 días ganancia(g)	Alimento ganancia
Nada	-	1559	266	1,70
Penicilina	200	-	315	1,50
Paizona	10	-	298	1,58
AM 374 H	10	-	284	1,62
AV 290D	10	-	282	1,59
Nada	-	1563	288	1,75
Penicilina	200	-	317	1,70
Paizona	10	-	289	1,75
AM 374 H	2	-	302	1,63
AV 290 D	2	-	312	1,70

Columna 4 $\sqrt{0-20}$ días; ganancia (g)] representa l del período de ensayo de 20 días.

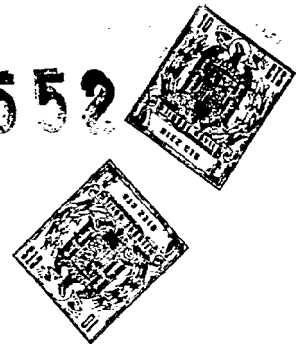
Columna 5 (alimentación/ganancia) representa la r consumido y gramos de ganancia de peso el cuerpo

Columna 7 $\sqrt{\%$ de mejora; (ganancia) representa la de peso, es decir $\sqrt{(315/266)100}-100 = 18,4$.

Columna 8 ($\%$ de mejora; F/G) representa la mejora gramos del alimento y gramos de ganancia de peso,

- J 5 - B en

378552



L A X

ALIMENTACION EN POLLOS QUE RECIBEN RACIONES DIVERSOS ADITIVOS

4	5	6	7	8
-20 días nancia(g)	Alimento ganancia	Relación de supervivencia	% mejora Ganancia	A/G
266	1,70	29/30	-	-
315	1,50	28/30	18,4	13,3
298	1,58	30/30	12,0	7,6
284	1,62	30/30	6,8	4,9
282	1,59	28/30	6,0	6,9
288	1,75	39/40	-	-
317	1,70	20/20	10,0	2,9
289	1,75	20/20	0,3	0,0
302	1,63	18/20	4,9	7,4
312	1,70	20/20	8,3	2,9

(g) \int representa la ganancia total de peso a través s.

a) representa la relación entre gramos del alimento de peso del cuerpo.

ia) representa la mejora porcentual en la ganancia $\frac{17-10}{10} \times 100 = 18,4$.

representa la mejora porcentual de la relación entre ganancia de peso, es decir $\frac{1,7-1,5}{1,5} \times 100 = 13,3$.

378552



EJEMPLO 9

Preparación de tabletas que contienen AM 374

Se incorpora al compuesto antiandrógeno AM 374 a una tableta farmacéutica común de acuerdo con la siguiente formulación.

5.	<u>Ingrediente</u>	<u>Por tableta mg.</u>
	AM 374	50
	Lactosa	225
	Almidón de maíz (para mezcla)	50
	Almidón de maíz (para pasta)	25
10.	Estearato de magnesio	<u>5</u>
		355

Se mezcla conjuntamente el ingrediente activo AM 374, lactosa y almidón de maíz para mezcla. Se suspende en agua el almidón de maíz para pasta en una relación de 100 g. de almidón de maíz por cada 800 ml. de agua y se calienta con agitación de manera de formar una pasta. Se utiliza entonces la pasta resultante para granular el polvo mezclado. Si fuera necesario se utiliza agua adicional. Se hace pasar los gránulos húmedos a través de un tamiz No. 8 y se seca a 48,9°C. Se hace pasar los gránulos secos a través de un tamiz No. 16 y se los lubrica con el estearato de magnesio. Se comprime entonces la granulación en forma de tabletas (peso de la tableta 355 mg.) en una máquina apropiada para la producción de tabletas. Cada tableta contiene 50 mg. de ingrediente activo.

EJEMPLO 10

Preparación de cápsulas de cáscara dura que contienen AM 374

378552



Se puede suministrar el ingrediente activo AM 374 en cápsulas de cáscara dura. La siguiente es una formulación que resulta útil para preparar cápsulas de esta clase:

	Ingrediente	Por cápsula mg.	Para 1000 cápsulas g.
5.	AM 374	50	50
	Lactosa	90	90
	Estearato de magnesio	<u>1</u>	<u>1</u>
		141	141

El ingrediente activo, la lactosa y el estearato de magnesio se mezclan conjuntamente. Se utiliza esta mezcla para llenar cápsulas de cáscara dura de tamaño apropiado, con un peso de llenado de 141 mg. por cápsula.

EJEMPLO 11

Preparación de solución oral que contiene AM 374

	Ingrediente	Cantidad % p/v.
15.	AM 374	1,00
	Gel de silicato de aluminio y magnesio	0,50
	Sacarosa	60,00
	Metilparabeno	0,08
	Propilparabeno	0,02
20.	Agente aromatizante	c.s.
	Agua destilada, c.s.p.	100,0

Se disuelven los parabenos y la sacarosa en aproximadamente

378552



dos tercios del volumen final de agua destilada a 80°C y se agrega la Veegum con agitación. Se enfría la solución a 40°C. Con agitación se agrega el ingrediente activo y el agente aromatizante. Se ajusta la solución enfriada hasta volumen final mediante agua destilada.

- 5. La solución provee 50 mg. de ingrediente activo por cada 5 ml. de dosis de la solución.

EJEMPLO 12

Se puede incorporar el componente activo AM 374 a una solución inyectable de acuerdo con la siguiente formulación:

10.	<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad % p/v.</u>
	AM 374	5,0
	Glicol polietilénico 4000 U.S.P.	4,0
	Cloruro de sodio U.S.P.	0,90
	Alcohol bencílico, calidad para reactivo	0,90
15.	Agua para inyección, c. s. p.	100,0

- 20. Se prepara el vehículo mezclando conjuntamente todos los ingredientes procedentes con excepción del AM 374. Mediante medios apropiados se esteriliza el vehículos y el ingrediente activo micronizado. Se prepara una solución del ingrediente activo en el vehículo, formando primeramente una lechada con el ingrediente activo y una porción del vehículo, y agregando entonces la porción restante del vehículo mientras se agita. Una dosis de 1 ml. de esta solución provee 50 mg. de ingrediente activo.



N O T A

5. 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 Norteamérica, Ser. No. 815.652 de 14 de abril de 1969, acogéndose 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 Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL ANTIBIOTICO AM 374., caracterizándose por lo siguiente:

10. 1.- Procedimiento para la producción del antibiótico AM 374, caracterizado porque comprende cultivar una cepa de *Streptomyces eburosporeus* nov. sp. productora de antibióticos AM 374 en un medio nutritivo acuoso bajo condiciones aeróbicas hasta que se comunica una sustancial actividad antibacteriana a dicho medio por la producción de antibiótico AM 374.

15. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende cultivar una cepa de *Streptomyces eburosporeus* nov. sp. productora de antibiótico AM 374 en un medio acuoso nutritivo bajo condiciones aeróbicas hasta que se comunica una sustancial actividad antibacteriana a dicho medio por la producción de antibiótico AM374 y aislando el antibiótico AM 374 así producido.



3.- Procedimiento para la producción del
antibiótico AM 374; tal y como queda sustancialmente
descrito en la presente memoria.

Esta memoria consta de cuarenta hojas escri-
tas a máquina por una sola cara.

Madrid, 11 AGO. 1972

AMERICAN CYANAMID COMPANY

L. GOMEZ ACEBO Y MOJER
p. p. Firmados L. Gacia Ferrández

378552

378552

14 ABR 1970
14 ABR 1970

ESCALA VARIABLE

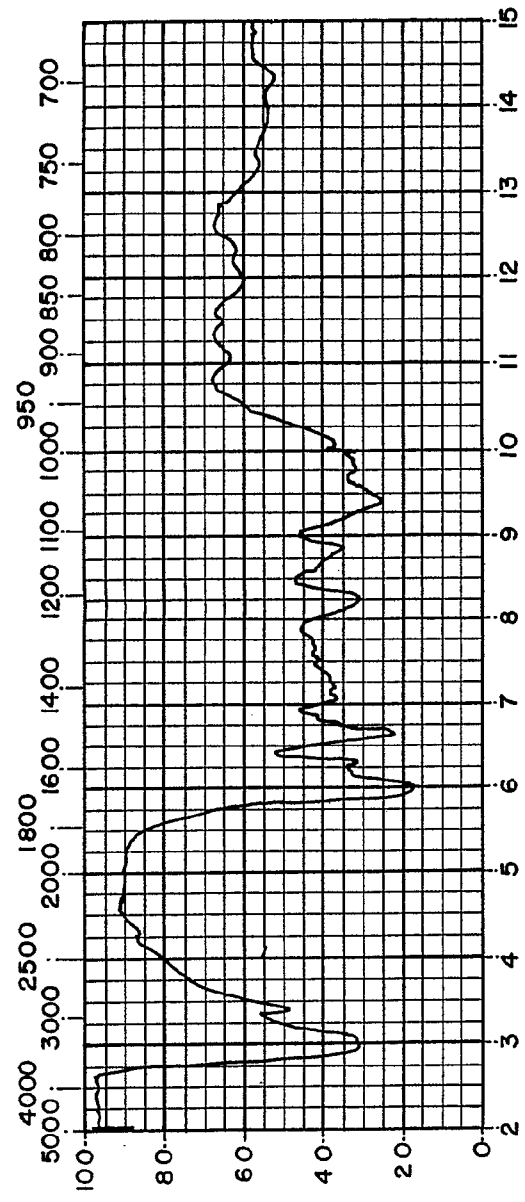


Fig. 1

14 ABR 1970
E. H. Hineson, E. Hineson & Hineson, Inc.

378552

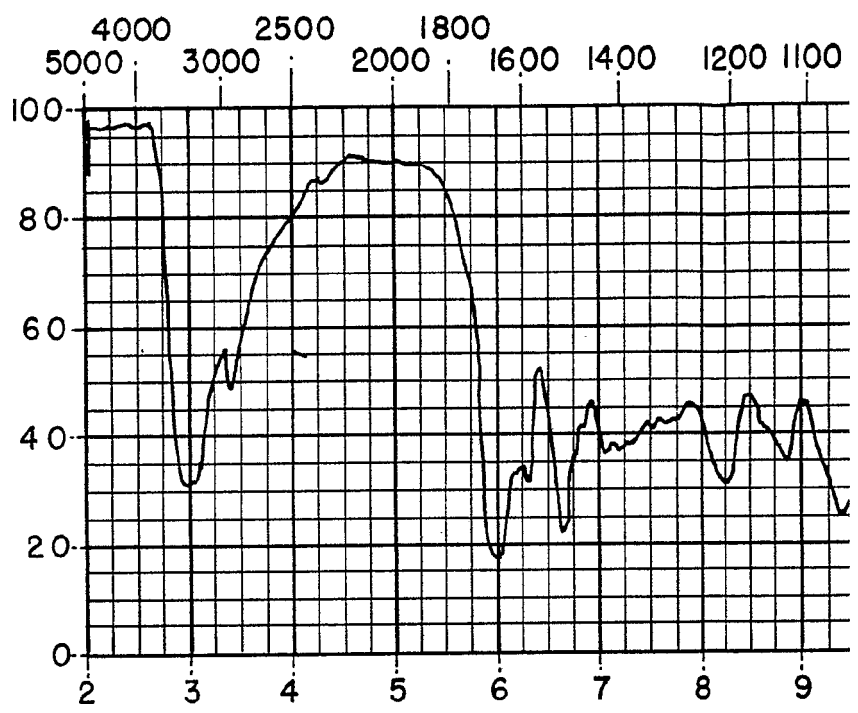
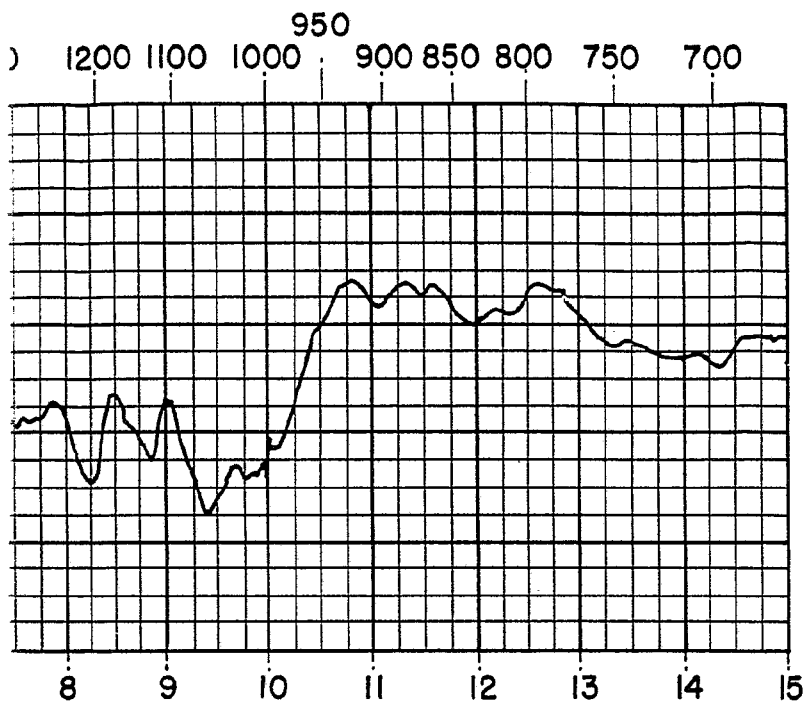
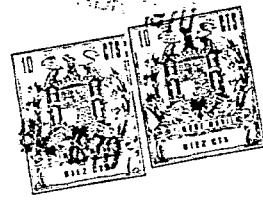


FIG.-1

578912



9-1

188 70