

409978



A1. 409.978 760701 C 12 D 9/14

Fa J-2-76

Int. Cl.:

C12D / A61K

No. 409.978

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: ELI LILLY AND COMPANY

RESIDENCIA: 307 EAST McCARTY STREET, -INDIANAPOLIS, -

INDIANA, -ESTADOS UNIDOS.

ENUNCIADO: METODO PARA LA PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS

NO NITROGENADOS ACIDOS.

Prioridad: Patente estadounidense.º 211.231 del 23-12-71

.TR

409978

- 2 -



1 Esta invención se refiere a nuevos antibióticos y
a un método para su producción. En particular, se refiere
a ciertos antibióticos ácidos, no nitrogenados y a sus sa-
les de metales alcalinos, metales alcalino-térreos y amonio.

5 Los antibióticos descritos aquí son denominados ar-
bitrariamente A28695A y A28695B. Son producidos junto con
otras sustancias antibióticas no identificadas por cultivo
del microorganismo Streptomyces albus NRRL 3883 en un medio
de cultivo nutritivo acuoso, en condiciones de fermentación
10 aerobia sumergida, hasta que se produce un nivel sustancial
de actividad antibiótica. El factor antibiótico A28695A es
producido con mayor-abundancia que el antibiótico A28695B.
Las otras sustancias antibióticas producidas en la fermenta-
ción se producen en cantidades tan pequeñas que su recupera-
15 ción no compensa.

El antibiótico A28695A, aislado de la mezcla A28695
de antibióticos, se obtiene en forma de sal sódico-potási-
ca mixta, cristalina blanca, con un punto de fusión de 161-
20 165°C.

La sal mixta sódico-potásica de antibiótico A28695A
es insoluble en agua, ligeramente soluble en metanol, solu-
ble en éter y soluble en ésteres como acetato de metilo,
acetato de etilo y similares; cetonas como acetona y metil-
etil-cetona; hidrocarburos halogenados como cloroformo e hi-
25 drocarburos aromáticos como benceno y tolueno. El antibióti-
co A28695A es estable en solución a valores de pH superio-
res a 4,0 y temperaturas de hasta 27°C. La rotación óptica
específica, $[\alpha]_D^{25}$, de la sal sódico-potásica mixta del anti-
30 biótico A28695 es de +14,07° (c = 1, metanol).

409978⁻³



1 El espectro de absorción infrarrojo del antibiótico
A28695A como sal mixta sódico-potásica en solución en cloro-
formo está en la Figura 1 de los dibujos que acompañan a es-
ta memoria. Se observan los siguientes máximos de absorción
5 distinguibles en el espectro, en el intervalo de 2,0 a 15,0
micras: 3,1-3,3, 3,4, 3,47, 6,24, 6,84, 7,00, 7,25, 7,37,
7,49, 7,68, 7,78, 8,1, 8,47, 8,61, 8,95, 9,11, 9,20, 9,42,
9,5, 9,80, 9,98, 10,24, 10,54, 10,87, 11,09, 11,5 y 11,66
micras. El antibiótico no presenta ningún diagrama de absor-
10 ción ultravioleta característico.

Un diagrama de difracción de rayos X en polvo de la
sal cristalina mixta sódico-potásica del antibiótico A28695A,
utilizando radiación de cromo filtrada por vanadio y una lon-
gitud de onda de $2,2896 \text{ \AA}$ para calcular las distancias inter-
15 planares de los siguientes valores:

<u>d</u>	<u>I/I₁</u>
18,23	1,00
14,75	1,00
20 13,26	0,40
12,05	0,60
9,53	0,40
9,01	0,50
8,27	0,30
25 8,02	0,30
7,61	0,30
7,36	0,50
6,93	0,02
6,69	0,60
30 6,02	0,40

409978

- 4 -



	\bar{d}	I/I_1
1	5,92	0,30
	5,59	0,10
	5,43	0,40
5	5,24	0,10
	5,09	0,20
	4,94	0,40
	4,76	0,05
	4,57	0,10
10	4,35	0,05
	4,16	0,02
	4,09	0,10
	3,98	0,05

15 El ácido libre del A28695A es un sólido cristalino blanco que funde a unos 97-99°C. El análisis elemental de la forma de ácido libre del antibiótico A28695A da la siguiente composición: 63,31 % de carbono, 8,83 % de hidrógeno y 28,03 % de oxígeno. Los datos del espectrómetro de masas sobre el antibiótico A28695A indican un peso molecular aproximado de 834. La valoración electrométrica de la sal sódica del antibiótico A28695A en etanol acuoso al 66 % indica la presencia de un grupo valorable con un valor del pKa de 5,51. El peso molecular de la sal sódica, determinado a partir de los datos de la valoración, es aproximadamente de 874. El peso molecular del ácido libre sería, por lo tanto, aproximadamente 852. Este valor es superior al valor obtenido en el espectro de masas. El valor calculado a partir de los datos del espectro de masas es probablemente el más preciso, debido a las limitaciones del método de valoración.

20

25

30 Los datos del espectro de resonancia magnética nuclear indi-



409978

1 can la presencia de 4 grupos metoxi en el antibiótico A28695A.

5 La sal mixta sódico-potásica del antibiótico A28695B es un compuesto cristalino blanco que funde a 170-172°C. El diagrama de solubilidad y estabilidad del antibiótico es similar al de la sal sódico-potásica mixta del antibiótico A28695A.

10 El espectro de absorción infrarrojo del A28695B como sal mixta sódico-potásica en solución en cloroformo está mostrado en la Figura 2 de los dibujos que acompañan a esta memoria. Las bandas distinguibles en el espectro infrarrojo sobre el intervalo de 2,0 a 15,0 micras son las siguientes: 3,0, 3,4, 3,47, 6,24, 6,85, 7,01, 7,26, 7,3, 7,68, 7,78, 8,1, 8,58, 8,82, 8,95, 9,11, 9,19, 9,45, 9,59, 9,82, 10,04, 10,28, 15 10,55, 11,10, 11,24 y 11,65 micras.

El antibiótico no presenta ningún diagrama de absorción ultravioleta característico.

La rotación óptica, $[\alpha]_D^{25}$, de la sal sódico-potásica mixta del antibiótico A28695B es +10,1° (c = 1, metanol).

20 La forma ácida del antibiótico A28695B es un sólido cristalino blanco con un punto de fusión de 122-124°C. El microanálisis da la siguiente composición elemental porcentual de la forma ácida del A28695B: 60,49 % de carbono; 9,15 % de hidrógeno y 31,32 % de oxígeno. Los datos del espectro de resonancia magnética nuclear indican que el antibiótico A28695B contiene tres grupos metoxi. Los datos del espectro de masas del antibiótico A28695B indican un peso molecular aproximado de 846. La valoración electrométrica del antibiótico A28695B como sal sódica en etanol acuoso al 30

409978



1 66 % indica la presencia de un grupo valorable con un valor
del pKa de 5,9. El peso molecular de la sal sódica del anti-
biótico A28695B, calculado a partir de los datos de la va-
loración es de 877 aproximadamente. El peso molecular del
5 ácido libre del antibiótico A28695B sería por lo tanto apro-
ximadamente 855.

Un diagrama de difracción de rayos X en polvo del an-
tibiótico cristalino ácido A28695B utilizando radiación de
cromo filtrada por vanadio y una longitud de onda de 2,2895
10 Å para calcular las distancias interplanares da los siguien-
tes valores:

	<u>d</u>	<u>I/I₁</u>
	13,54	0,50
15	12,63	0,05
	11,52	0,15
	9,96	0,02
	9,39	0,60
	7,88	0,20
20	7,52	0,20
	7,08	0,30
	6,66	1,00
	6,46	0,20
	6,28	0,20
25	6,05	0,30
	5,81	0,50
	5,57	0,20
	5,33	0,70
	4,92	0,60
30	4,63	0,60

409978

- 7 -



	<u>d</u>	<u>I/L₁</u>
1	4,51	0,20
	4,29	0,30
5	4,14	0,30
	3,98	0,10
	3,84	0,60
	3,73	0,05
	3,66	0,05
10	3,57	0,05
	3,48	0,05
	3,22	0,15
	3,07	0,10
	3,05	0,02
15	2,94	0,02
	2,84	0,02
	2,72	0,10
	2,56	0,02
	2,33	0,02
20	2,27	0,02
	2,15	0,05
	2,09	0,02
	2,07	0,02
	2,03	0,02

25 El comportamiento en cromatografía de papel de las sales mixtas sódico-potásicas de A28695A y B está indicado por los valores R_f en la Tabla I dada a continuación. Los valores se obtuvieron en los sistemas disolventes indicados, utilizando en cada caso un papel Whatman nº 1. La situación

30 de los antibióticos sobre el cromatograma fué determinada por

409978

- 8 -



MAY 1970

1 bioautografía utilizando Bacillus subtilis como organismo detector.

TABLA I

Cromatografía en papel de los antibióticos A28695A y A28695B

Sistema disolvente	Valor Rf ^{RI}	
	A28695A	A28695B
Agua saturada con butanol	0,53	0,83
Agua saturada con butanol; 2 % de ácido p-toluensulfónico; 1 % de piperidina	0,64	0,76
10 Agua saturada con metil-isobutil-cetona; 2 % de ácido p-toluensulfónico; 1 % de piperidina	0,58	0,74
Agua/metanol/acetona (12:3:1) ^{XXX}	0,25	0,54
Benceno saturado con agua	0,57	0,48

15 ^{RI} El valor Rf se define como la relación entre la distancia recorrida por el antibiótico desde el origen y la distancia recorrida por el frente de disolvente desde el origen.

^{XXX} Esta solución se ajusta a pH 10,5 con NH₄OH y después el pH se reduce a 7,5 con H₃PO₄.

20 La cromatografía en capa fina sobre placas de gel de sílice con una pulverización de vainillina como agente detector también se utilizó para identificar y separar los antibióticos A28695A y B. El comportamiento cromatográfico sobre gel de sílice está indicado a continuación.

TABLA II

Cromatografía en capa fina de los antibióticos A28695A y

Sistema disolvente	Valor Rf	
	A28695A	A28695B
Benceno/acetato de etilo (1:1)	0,71	0,61
Cloroformo/acetato de etilo (2:3)	0,69	0,61
30 Benceno/acetona (9:1)	0,29	0,20

409978⁹



1975

1 Los nuevos antibióticos de esta invención presen-
tan una acción inhibitoria contra el desarrollo de los orga-
nismos microbianos, tanto bacterias como hongos, que son pa-
tógenos para la vida de los animales y plantas y, por lo
5 tanto, son útiles en la supresión del crecimiento de estos
organismos. Las concentraciones mínimas de inhibición de las
sales mixtas de sodio y potasio de ambos antibióticos
A28695A y A28695B, determinadas por el ensayo de dilución
en agar con organismos ilustrativos, se encuentran en la
10 Tabla III.

TABLA III

Actividad microbiológica de los antibióticos A28695A y

A28695B

15

<u>Organismo de ensayo</u>	<u>Concentración mínima de inhibición (mcg/ml)</u>	
	<u>A28695A</u>	<u>A28695B</u>
<u>Staphylococcus aureus</u>	<1,56	6,25
<u>Streptococcus faecalis</u>	<1,56	12,50
<u>Botrytis cinerea</u>	25,00	25,00

20 Cuando se someten a ensayo en disco-placa, ambos
antibióticos, A28695A y A28695B, presentan zonas discerni-
bles de inhibición contra los microorganismos Bacillus sub-
tilis, Mycobacterium avium y Sarcina lutea.

25 Cuando el antibiótico A28695B se ensaya en un sis-
tema de cultivo de virus-tejido, presenta actividad contra
los siguientes virus: virus de la vacuna, poliovirus III,
virus Semliki Forest, virus del herpes y virus de la gripe
del Japón 305. Los antibióticos de esta invención, cuando se
prueban en plantas, evitan el desarrollo de ciertas enferme-
dades de las plantas. Un preparado de una mezcla de los anti-
30

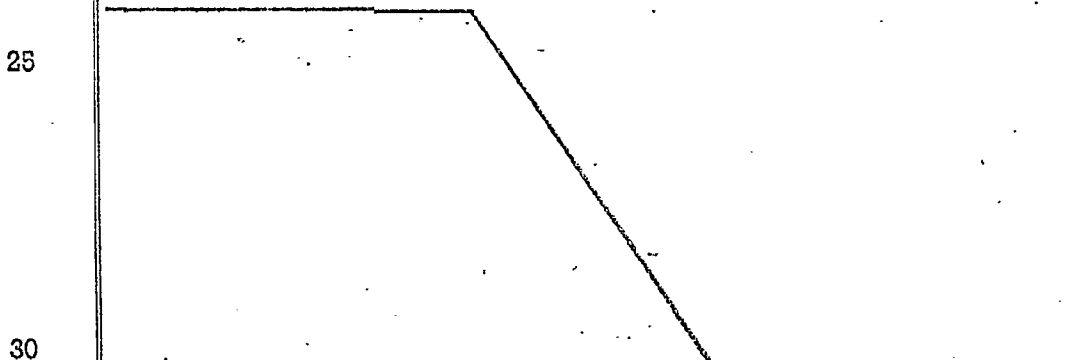
409978



1 bióticos A28695A y B, cuando se aplica como pulverización,
es activo contra la enfermedad mildiú pulverulento en las
plantas de judía y contra la enfermedad de agallas en corona
5 en las plantas de tomate. Una mezcla de los antibióticos
A28695A y B también es activa contra las enfermedades víri-
cas de las plantas, virus del mosaico de la judía del sur
y virus del enanismo del maíz, cuando se aplican a plantas
infectadas como pulverización o inundación.

10 Además de las actividades citadas, los antibióti-
cos A28695 también presentan actividad insecticida. Por ejem-
plo, el grado de destrucción de las moscas domésticas en con-
tacto con una solución de antibiótico A28695A o de antibió-
tico A28695B a una concentración de 100 ppm es del 88 %. A
15 una concentración de 250 ppm, el grado de destrucción es
del 99 %.

Todavía otra importante propiedad de los antibió-
ticos A28695 es su capacidad para evitar el desarrollo de la
coccidiosis en la aves. Los resultados observados cuando ca-
20 da uno de estos antibióticos es agregado al pienso de los
pollos infectados con una infección combinada de Eimeria
tonella, Eimeria necatrix, Eimeria máxima, y Eimeria acervu-
lina están indicados en la siguiente tabla:





1975

TABLA IV

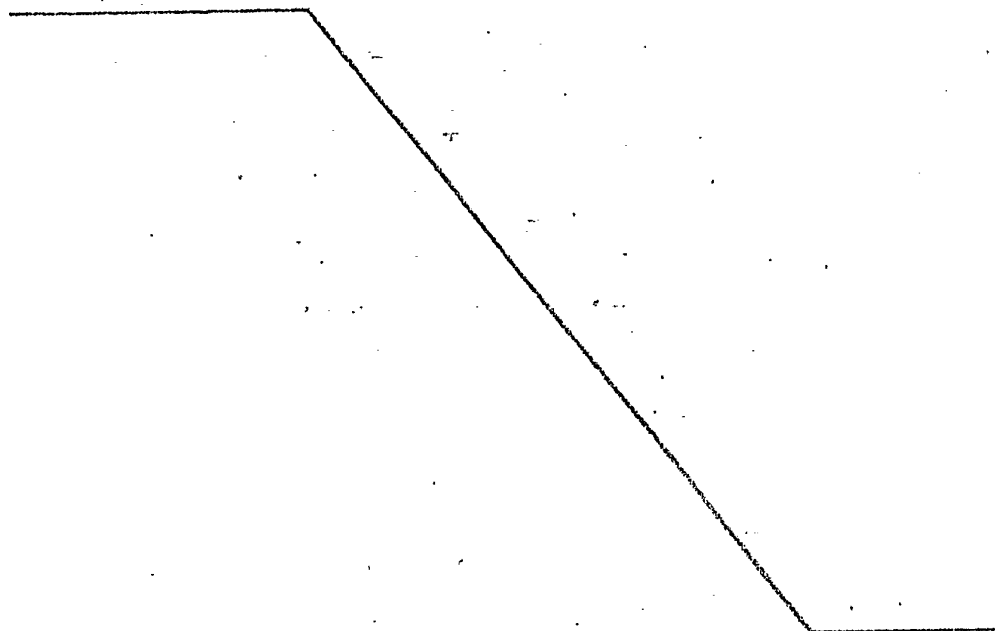
Actividad de los antibióticos A28695 contra la coccidiosis
en pollos

Grupo de ensayo	Nivel en el pienso % en peso	Mortalidad %	Aumento de peso * %	Reducción en el número de lesiones % ^{xxx}	
				Intestinal	Cecal
A28695A	0,01	0	76	100	100
	0,005	0	100	100	66
	0,0025	0	80	90	<40
A28695B	0,02	0	90	100	96
Controles infectados		15	36	0	0
Controles normales		0	100	-	-

* Controles normales tomados como 100 %

xxx Comparados con los controles infectados.

Los resultados observados con pollos infectados con E. tenella están indicados en la Tabla V.



409978



TABLA V

Eficacia de los antibióticos A28695A y A2869B contra *Eimeria tenella* en pollos

Grupo de ensayo	Nivel en el pienso % en peso	Mortalidad %	Aumento de peso %	Reducción en el número de lesiones %
A28695A	0,005	0	100	90
	0,0025	0	100	33
	0,00125	0	80	0
A28695B	0,03	0	93	100
	0,02	0	100	100
Controles infectados		20	72	0
Controles normales		0	100	-

^H Controles normales tomados como 100 %
^H Comparado con controles infectados

La toxicidad aguda del antibiótico A28695A en ratones, expresada como DL₅₀, es alrededor de 41,1 mg/kg de peso corporal cuando el antibiótico se administra por vía oral. La DL₅₀ del antibiótico A28695B, cuando se administra por vía oral a ratones, es alrededor de 43,5 mg/kg de peso corporal.

Como se discutirá con más detalle más adelante, los antibióticos A28695 individuales y sus mezclas aumentan la utilización de hidratos de carbono en los rumiantes y con ello proporcionan una mayor eficacia de alimentación de estos animales. Como demuestran los ensayos *in vitro* realizados con fluido del rumen, los antibióticos afectan a la composición de ácidos grasos libres volátiles en el rumen.

409978

- 13 -



1

En particular, los antibióticos aumentan la cantidad de propionato asequible para el metabolismo de los rumiantes. El propionato se utiliza con mayor eficacia que el acetato que se encuentra presente en mayor abundancia en los animales

5

no tratados.

Otra propiedad característica de los antibióticos A28695 es su capacidad para formar complejos con los cationes monovalentes. En los experimentos para determinar la especificidad iónica, el antibiótico A28695A presenta especificidad para los iones potasio y los iones rubidio, mientras que el antibiótico A28695B presenta especificidad para los iones sodio y potasio. El uso de electrodos específicos iónicos es importante en muchos análisis químicos. Debido a sus propiedades únicas, los antibióticos A28695A y B son adecuados como componentes de electrodos específicos iónicos.

10

15

20

Los complejos formados por los antibióticos A28695 con cationes monovalentes son solubles en los lípidos y, por lo tanto, facilitarán el transporte de los iones a través de las membranas. Los antibióticos que presentan estas propiedades son denominados en general ionoforos.

25

Los efectos de los antibióticos A28695 sobre el transporte de iones pueden ser medidos en un sistema utilizando mitocondrio de hígado de rata y el antibiótico valinomicina. Ambos antibióticos A28695A y A28695B invierten el efecto estimulante de la valinomicina sobre la hidrólisis del adenosintrifosfato en el mitocondrio del hígado de rata.

30

Los nuevos antibióticos de esta invención son producidos cultivando una variedad recién descubierta de un organismo actinomiceto bajo condiciones aerobias sumergidas.

409978



1975

1 en un medio de cultivo nutritivo, hasta que el medio de cul-
tivo contiene una actividad antibiótica sustancial. Los an-
tibióticos pueden ser recuperados del medio de fermentación
empleando varios procedimientos de aislamiento y purificación
5 conocidos en la técnica.

El actinomiceto usado en la producción de los an-
tibióticos de esta invención ha sido identificado como una
variedad de Streptomyces albus (Rossi-Doria) Waksman y Hen-
rici. El organismo ha sido depositado sin restricción en
10 cuanto a su disponibilidad en la colección de cultivos per-
manentes de la Northern Utilization Research and Development
Division, Agricultural Research Service, Departamento de Agr-
cultura de Estados Unidos, Peoria, Illinois. Su número de
15 accesión en esta colección en el NRRL 3883. La variedad fue
aislada de una muestra de tierra recogida en Curaçao (Anti-
llas Holandesas). Unas porciones de la muestra de tierra fue-
ron suspendidas en agua desionizada estéril y las suspensio-
nes fueron depositadas en tiras sobre agar nutritivo en dis-
20 cos Petri. Después de incubar a 25-35°C, hasta conseguir el
crecimiento, las colonias de los organismos productores del
antibiótico A28695 fueron transferidas a unos tubos inclina-
dos de agar con un aro de platino estéril. Los tubos inclina-
dos de agar fueron después incubados para proporcionar un
25 inóculum adecuado para la producción de A28695.

Los métodos empleados en los estudios taxonómicos
del cultivo productor de A28695, NRRL 3883, fueron los reco-
mendados por el International Streptomyces Project [Shirling
and Gottlieb, Intern. Bull. Systematic Bacteriol., 16; 313-
30 340 (1966)], junto con ciertos ensayos suplementarios. Los



1975

1 resultados de los estudios taxonómicos están resumidos en
 los párrafos que siguen. Los nombres de los colores fueron
 atribuidos de acuerdo con el método Inter-Society Color
 Council-National Bureau of Standards (ISCC-NBS) (Kelly y
 5 Judd, The ISCC-NBS Method of Designating Colors and a Dic-
 tionary of Color Names, U.S. Dept. of Commerce Circ. 553,
 Washington, D.C., 1955). Las letras entre paréntesis se re-
 fieren a los bloques de color y las letras subrayadas y los
 números a las proyecciones de colores en la serie de colores
 10 Tresner y Backus [Appl. Microbiol. 11:335-338 (1967)]. Las
 designaciones de bloques de color Maerz y Paul [Dictionary
 of Color, McGraw-Hill Book Co., Inc., New York (1950)], es-
 tán entre corchetés. Los números ISP se refieren a los me-
 15 dios del International Streptomyces Project, Shirling y
 Gottlieb, (que pueden solicitarse a los Difco Laboratories,
 Detroit, Michigan). Las observaciones se realizaron después
 de incubar a 30°C durante 14 días, salvo indicación en con-
 trario.

20 Morfología microscópica, características de cultivo y fisio-
 logía

Morfología microscópica: Los esporoforos tienen forma espi-
 ral. Las esporas son ovales (1,0-
 1,25 μ x 0,5-1,0 μ) y aparecen en
 cadenas de 10 a 50.

Características de cultivo:

25 Medio ISP nº 2 Crecimiento abundante; reverso
 pardo amarillento ligero [11E5].
 Buen micelio aéreo y esporulación,
 blanco (W) a. Sin pigmento soluble.

Medio ISP nº 3 Crecimiento mediano; reverso blan-
 co. Micelio aéreo y esporulación
 medianos, blanco (W) a, con zonas
 dispersas de amarillo claro, (Y)
 1 1/2 fb.

30



409978

1	<u>Medio ISP nº 4</u>	Crecimiento abundante; reverso amarillo pálido [10F3]. Micelio aéreo y esporulación abundantes, blanco (W) a. Pigmento soluble pardo ligero
5	<u>Medio ISP nº 5</u>	Crecimiento entre bueno y abundante; reverso amarillo ligero [10J2]. Micelio aéreo y esporas entre bueno y abundante, amarillo pálido (Y) 2ba. Sin pigmento soluble.
10	<u>Maleta cálcico</u>	Buen crecimiento; reverso amarillo ligero [10F3]. Micelio aéreo y esporulación moderados, amarillo pálido (Y) 1ba. Sin pigmento soluble o ligero pigmento amarillo
15	<u>Medio de Czapek</u>	Buen crecimiento; reverso amarillo ligero [9J2]. Buen micelio aéreo y esporulación, amarillo pálido (Y) 2ba. Sin pigmento soluble.
15	<u>Pasta de tomate-harina de avena</u>	Crecimiento abundante; reverso amarillo pálido [10-B2]. Buen micelio aéreo y esporulación, gris amarillento (G) 2dc. Sin pigmento soluble

Fisiología:

20	<u>Requisitos de temperatura</u>	Buen crecimiento y esporulación a 26-37°C. Crecimiento nulo a 43°C, 49°C o 55°C.
20	<u>Leche descremada</u>	No se cuaja ni clarifica al cabo de 21 días. Anillo superficial de crecimiento; sedimento
25	<u>Gelatina</u>	Licuefacción completa al cabo de 21 días
30	<u>Reducción de nitratos</u>	Ligera reducción al cabo de 21 días.

La Tabla VI contiene los resultados de los ensayos de utilización de carbono realizados sobre el cultivo productor de A26895, NRRL 3883. Los símbolos empleados en la tabla son los siguientes:

- + = utilización positiva
- (+) = utilización probable
- (-) = utilización cuestionable
- = utilización nula

409978-17 -



1975

1

TABLA VI

Utilización de carbono del NRRL 3883

5

10

15

20

25

30

<u>Substrato</u>	<u>Respuesta</u>
Inositol	(+)
Manitol	+
Celulosa	(-)
Celobiosa	+
Fructosa	+
Arabinosa	+
Ramnosa	+
Rafinosa	+
Xilosa	+
Dextrosa	(+)

El cultivo productor de A28695 (NRRL 3883) al parecer es muy similar a la variedad de Streptomyces albus ATTC 3004 descrita por Pyons y Pridham, J. Bacteriol., 83: 370-380 (1962). Se producen variaciones en la utilización de cuatro fuentes de carbono y en el desarrollo por encima de 37°C. El cultivo de NRRL 3883 empleado en esta invención es también similar al NRRL 3384, que produce el antibiótico A204 [Patente belga nº 728.382 (13-8-69)]; las diferencias observadas indican que el NRRL 3384 produce unas esporas ligeramente más largas, no licúa la gelatina y crece a temperaturas algo más altas.

El medio de cultivo empleable en la producción de antibióticos A28695A y B por cultivo del organismo antes descrito puede ser uno cualquiera entre varios ya que, como resulta evidente de los ensayos de utilización antes descritos, el organismo es capaz de utilizar diferentes fuentes de energía. Sin embargo, por razones de economía

409978



1 de producción, máximo rendimiento del antibiótico y facilidad
de aislamiento del mismo, se prefieren ciertos medios de
cultivo que contienen fuentes de nutrientes relativamente
simples. Por ejemplo, los medios útiles en la producción de
5 antibióticos A28695A y B incluyen una fuente asimilable de
carbono como glucosa, manitol, fructosa, almidón soluble,
dextrina, melazas, azúcar moreno y similares. Las fuentes pre-
feridas de carbono son la glucosa y la dextrina. Adicional-
mente, los medios empleados incluyen una fuente de nitrógeno
10 asimilable como harina de avena, extracto de buey, caseína
hidrolizada, licor de infusión de maíz, extracto de levadura,
harina de soja, peptonas (carne o soja) y similares. Las
fuentes preferidas de nitrógeno son harina de soja y caseína
hidrolizada al ácido.

15 Pueden incorporarse a los medios, con resultados be-
neficiosos, sales minerales como las que proporcionan iones
calcio, magnesio, sodio, potasio, cobalto, cloruro, sulfato
y carbonato y una fuente de factores del crecimiento, como
20 levadura o extracto de levadura.

Como ocurre con muchos microorganismos, se cree con-
veniente incluir los llamados "elementos traza" en el medio
de cultivo para desarrollar el actinomiceto NRRL 3883. Estos
elementos traza son suministrados comúnmente como impurezas
25 accidentales a la adición de los otros constituyentes del
medio.

La producción del compuesto de la invención puede ser
efectuada a cualquier temperatura que conduzca al desarrollo
satisfactorio del microorganismo, por ejemplo entre unos
30 26°C y 40°C y preferiblemente entre unos 26° y 30°C. Normal-

409978

- 19 -



MAY 1975

1 mente, la producción óptima de los antibióticos se obtiene
en unos 2 a 5 días.

5 El pH inicial del medio de cultivo puede ser variado
dentro de amplios límites. Sin embargo, se ha encontrado con
veniente que el pH inicial del medio esté comprendido entre
6,5 y 7,2. Como se ha observado con otros actinomicetos, el
pH del medio aumenta gradualmente a través del periodo de
10 crecimiento del organismo y puede alcanzar un nivel compren-
dido entre 7,0 y 8,0 o más, aproximadamente, dependiendo el
pH final por lo menos en parte del pH inicial del medio, de
los reguladores presentes en el medio y del periodo de tiem-
po durante el cual se permite crecer al organismo. Se obtie-
nen cómodamente pequeñas cantidades del antibiótico median-
te matraces sacudidos y cultivos superficiales en fras-
15 cos. Para la producción de cantidades sustanciales del anti-
biótico A28695, sin embargo, se emplea preferiblemente el
cultivo aerobio sumergido en grandes tanques.

20 Con objeto de evitar un retraso pronunciado en la
producción del antibiótico con la consiguiente ineficacia
en la utilización del equipo, se prefiere utilizar la forma
vegetativa más que la esporulada del organismo para la ino-
culación del medio en los tanques de producción. En conse-
cuencia, en primer lugar se prepara un inoculum vegetativo
25 del organismo por inoculación de unas cantidades relativa-
mente pequeñas del medio de cultivo con la forma esporulada
del organismo y el inoculum vegetativo activo joven así ob-
tenido se transfiere después asépticamente a los grandes
tanques de producción. El medio en el que se produce el ino-
30 culum vegetativo puede ser igual al utilizado para la produc

409978

- 20 -



1 ción del antibiótico, aunque pueden emplearse ventajosamente otros medios.

Como es costumbre en los procesos de cultivo aerobio sumergido, se hace pasar aire estéril a través del medio
5 de cultivo. Para un desarrollo del organismo y una producción del antibiótico eficientes, el volumen de aire empleado en la producción en tanques de los antibióticos A28695A y A28695B es preferiblemente superior a 0,1 volúmenes de aire por minuto y por volumen de medio de cultivo. Se obtiene un crecimiento eficaz y unos rendimientos óptimos de
10 los antibióticos A28695A y A28695B cuando el volumen de aire utilizado es por lo menos de 0,3 volúmenes de aire por minuto y por volumen de medio de cultivo.

La concentración de actividad antibiótica en el medio de cultivo puede ser seguida fácilmente durante el periodo de fermentación sometiendo a ensayo unas muestras del medio de cultivo para determinar su actividad inhibitoria
15 contra el crecimiento de un organismo que se sabe que es inhibido en presencia de los antibióticos A28695A y A23695B. Se ha encontrado que es adecuado para este fin el uso del organismo Bacillus subtilis. El ensayo puede realizarse por métodos conocidos turbidométricos o de disco-placa.
20

Puede utilizarse una variedad de procedimientos en el aislamiento y purificación de los antibióticos A28695A y A28695B; por ejemplo, extracción con disolventes, uso de adsorbentes y columnas cromatográficas. Los procedimientos de extracción con disolvente son los preferidos para la producción comercial, ya que son menos prolongados y menos costosos y con ellos se obtienen rendimientos de recuperación
25
30



1975

409978

1

más altos.

5

10

15

20

25

30

La actividad antibiótica está localizada tanto en el micelio como en la malta de fermentación. El micelio puede ser separado de la malta de fermentación por filtración mediante un auxiliar de filtración y tanto la torta de micelio como el medio de fermentación filtrado son extraídos con un disolvente orgánico adecuado para recuperar la actividad de A28695. Alternativamente, la malta de fermentación sin filtrar puede ser extraída con un disolvente orgánico para recuperar la actividad antibiótica. Los disolventes de extracción adecuados son, por ejemplo, acetato de etilo, acetato de amilo, butanol, pentanol, etanol, metanol o cloroformo. Los extractos antibióticos se evaporan a presión reducida para obtener una mezcla impura de los antibióticos A28695 como residuo oleoso. Los antibióticos así recuperados están presentes en forma de sus sales sódico-potásicas mixtas. Puede realizarse otra purificación de la mezcla antibiótica por cromatografía del residuo oleoso sobre un adsorbente adecuado como carbón activo o gel de sílice. Un adsorbente de carbón activo como el carbono Pittsburgh es un adsorbente preferido para purificar la mezcla de antibióticos A28695.

Los antibióticos individuales pueden ser separados de la mezcla mediante una nueva cromatografía. Así, por ejemplo, la mezcla de las sales sódico-potásicas de A28695A y B puede ser disuelta en un sistema disolvente constituido por benceno/acetato de etilo (9:1) y la solución así obtenida puede ser cromatografiada en una columna rellena con gel de sílice. Después la columna se eluye con la misma mezcla

409978

- 22 -



1 disolvente y se recogen fracciones múltiples. El progreso
del fraccionamiento es medido examinando las fracciones in-
dividuales sobre cromatogramas en capa fina o cromatogramas
en papel. Se combinan las fracciones que contienen cada anti-
5 biótico individual y el disolvente se separa por evaporación
para dar en forma sustancialmente pura los antibióticos sepa-
rados, en forma de sus sales sódico-potásicas mixtas.

10 Esta invención tiene una especial utilidad en los ru-
miantes con una función del rumen desarrollada. Los rumian-
tes jóvenes, fundamentalmente los que todavía no han sido
destetados, funcionan como animales monogástricos. Utilizan
sus alimentos líquidos simples exactamente como lo hacen los
animales monogástricos. A medida que los rumiantes jóvenes
15 comienzan a ingerir alimentos sólidos que contienen celulosa,
almidón y otros hidratos de carbono, comienza a desarrollar-
se la función del rumen y la población microbológica del
mismo comienza a aumentar. Después de que el animal ha comi-
do piensos sólidos durante algún tiempo, su función del ru-
20 men alcanza el desarrollo total y continúa operando durante
toda la vida del animal.

Esta invención funciona en todos los rumiantes, es de-
cir en todos los animales que poseen estómagos múltiples,
uno de los cuales es un rumen. Los animales rumiantes de
25 importancia económica son el ganado vacuno, las ovejas y las
cabras.

Debe entenderse que la utilidad de este método no se
limita a los animales que están siendo engordados o a los ani-
males jóvenes en desarrollo. Cuando el método se aplica a
30 animales adultos, como vacas lecheras o animales de cría,



8 MAY. 1915

409978

1

sus beneficios se traducen en un consumo reducido de pienso.

5

Los animales deben recibir una cantidad del antibiótico que afecte al rumen, con objeto de conseguir los beneficios del método. La cantidad mínima que afecta al rumen varía con la dieta del animal, su estado y su edad. Un intervalo satisfactorio es el comprendido aproximadamente entre 0,02 mg/kg/día y 2,0 mg/kg/día. El intervalo preferido es alrededor de 0,05 mg/kg/día a 1 mg/kg/día.

10

Los siguientes ejemplos ilustran la producción de A28695.

EJEMPLO 1

Fermentación en matraz sacudido de A28695

15

El cultivo productor de A28695 se prepara y mantiene en un tubo inclinado de agar con la siguiente composición:

20

Dextrina 700 ^{xi}	10,0 g
N-Z amina A ^{xii}	2,0 g
Extracto de buey	1,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
Agar	20,0 g
Agua desionizada	1 litro

^{xi} dextrina de patata importada de Holanda

25

^{xii} Sheffield Chemical Co., Division of National Dairy Products Corp., Norwich, N.Y.

30

El tubo inclinado se inocula con el cultivo productor de A28695, NRRL 3883 y se incuba a 30°C durante 4 a 6 días. El tubo inclinado esporulado se cubre con una pequeña cantidad de agua desionizada estéril y se rasca suavemente para proporcionar una suspensión acuosa de esporas.

409978

- 24 -



1975

1 Se utiliza 1 ml de la suspensión de esporas resultante para inocular 100 ml de medio vegetativo estéril con la siguiente composición:

Glucosa	15,0 g
5 Harina de soja	15,0 g
Sólidos de infusión de maiz	5,0 g
CaCO ₃	2,0 g
NaCl	5,0 g
Agua corriente	1 litro

10 El medio vegetativo inoculado se incuba durante 24-48 horas a 30°C en un sacudidor recíproco, con un recorrido de 2" (5 cm), que opera a 108 recorridos por minuto. Después se emplean 5 ml del cultivo resultante para inocular 100 ml de medio de producción esterilizado contenido en un Erlenmeyer de 500 ml y con la siguiente composición:

Harina de soja	15,0 g
Caseína	1,0 g
NaNO ₃	3,0 g
20 Jarabe de glucosa	20,0 g
Agua corriente	1 litro

El medio inoculado se deja fermentar durante 42-72 horas a 25-30°C en un sacudidor rotatorio que opera a 250 rpm. El pH final observado es alrededor de 7,0.

25 EJEMPLO 2

Fermentación en tanque de A28695

El cultivo productor de A28695 se prepara y mantiene en un tubo inclinado de agar con la siguiente composición:

Dextrina	10,0 g
30 Extracto de levadura	1,0 g

409978



1	Caseína hidrolizada con enzima	2,0 g
	Extracto de buey	1,0 g
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,01 g
	Agar	20,0 g
5	Agua desionizada	1 litro

El pH del medio se ajusta a 7,0 con solución de hidróxido sódico. Después de esterilización a vapor, calentando en autoclave a una presión de 15-20 libras (1-1,4 kg/cm²) durante 30 minutos, el pH del medio es 6,9.

10 El tubo inclinado se inocula con el cultivo productor de A28695, NRRL 3883, y se incuba a 30°C durante 10 días. El tubo inclinado esporulado se cubre con una pequeña cantidad de agua desionizada estéril y se rasca suavemente para formar una suspensión acuosa de esporas.

15 Cada tubo inclinado se utiliza para inocular seis matraces de 250 ml, conteniendo cada uno 50 ml de un medio de cultivo vegetativo estéril con la siguiente composición:

20	Glucosa	15,0 g
	Salvado de soja	15,0 g
	Licor de infusión de maíz	10,0 g
	NaCl	5,0 g
	CaCO ₃	2,0 g
	Agua corriente	1,1 litros

25 El pH del medio se ajusta a 6,5 con solución de hidróxido sódico y permanece inalterado por esterilización en autoclave a una presión de 15-20 libras (1,0-1,4 kg/cm²) durante 30 minutos.

30 El medio inoculado se deja fermentar durante 72 horas a 30°C en un sacudidor rotatorio que opera a 250 rpm. Se



409978

1 utilizan 10 ml del cultivo resultante para inocular 200 ml de un medio de crecimiento de segunda fase, esterilizado, contenido en un matraz de 1 litro y con la misma composición antes descrita.

5 El medio inoculado se deja fermentar durante 30 horas a 30°C en un sacudidor recíproco que opera a 250 rpm. Se emplean 200 ml del cultivo resultante para inocular 25 litros del siguiente medio, contenido en un fermentador de 40 litros:

	<u>Ingrediente</u>	<u>Porcentaje</u>
10	Glucosa	2,5
	Salvado de soja	1,5
	Caseína hidrolizada con ácido	0,1
	Melazas "	0,3
	CaCO ₃	0,25
15	Agua corriente	95,35

El pH del medio es 7,2 después de esterilización en autoclave a una presión de 15-20 libras (1,0-1,4 kg/cm²) durante 30 minutos.

20 El medio inoculado es aireado a un caudal de 0,3 volúmenes de aire por volumen de cultivo por minuto y agitado con agitadores convencionales a 350 rpm.

La fermentación se lleva a cabo a 30°C durante 5 días.

EJEMPLO 3

Aislamiento de la mezcla antibiótica

25 Empleado un auxiliar de filtración comercial, se filtran 92 litros del caldo de fermentación completo obtenido de la fermentación de A28695. La torta micelial se suspende en 25 litros de metanol y la mezcla se agita fuertemente

30

409978

- 27 -



1 durante 30-60 minutos. Se filtra la mezcla y el filtrado se
concentra para separar el metanol. La fase acuosa así obten-
da se combina con el filtrado del caldo de fermentación ori-
ginal.

5 La torta micelial extraída se suspende después en
25 litros de acetato de etilo y la suspensión se agita du-
rante 30-60 minutos. Se filtra la mezcla y se desprecia la
torta micelial.

10 El caldo filtrado se extrae entonces dos veces con
medios volúmenes de acetato de etilo. El caldo agotado se
desprecia. Los extractos en acetato de etilo se combinan
con el extracto en acetato de etilo de la torta micelial.

15 Alternativamente, la actividad A28695 se extrae del
medio de fermentación no filtrado mediante el siguiente pro-
cedimiento: se agitan 92 litros del medio de fermentación
completo con un volumen igual de acetato de etilo. Se fil-
tra la mezcla y el filtrado resultante se separa en una fa-
se de acetato de etilo y una fase acuosa. Se desprecia la
fase acuosa y la fase de acetato de etilo se conserva para
20 ser combinada con un segundo extracto.

Entonces se extrae por segunda vez con acetato de
etilo la masa micelial ya extraída. La masa micelial se
desprecia. El extracto en acetato de etilo se combina con
el extracto original.

25 Los extractos reunidos se concentran hasta dar un
residuo oleoso. El aceite resultante se disuelve en 1 litro
de cloroformo. La solución clorofórmica se pasa por una co-
luna de 5,5 x 100 cm de carbono Pittsburgh (12 x 40 mallas,
rellena en cloroformo. La columna se lava con 20 litros de
30 cloroformo. El efluente clorofórmico y las aguas de lavado

409978



1 se combinan y concentran hasta dar un residuo seco. Se recuperan 70,4 g de actividad A28695.

EJEMPLO 4

Separación de los antibióticos A28695A y A28695B

5 En una mezcla 9:1 de benceno y acetato de etilo se disuelven 30 g de la mezcla antibiótica cruda A28695 obtenida por el procedimiento descrito en la sección anterior. La solución se pasa por una columna de 5,5 x 115 cm de gel de sílice (calidad Grace, nº 62, Davison Chemical, Baltimore, Maryland 21226). El adsorbente ha sido lavado previamente
10 con una mezcla 9:1 de benceno y acetato de etilo. La columna se lava con 6 litros de una mezcla 9:1 de benceno/acetato de etilo y el efluente y las aguas de lavado se desprecian. Después la columna se eluye con una solución 4:1 de benceno/
15 acetato de etilo. El eluato se recoge en fracciones múltiples, saliendo el antibiótico A28695A de la columna en las primeras fracciones, mientras que el antibiótico A28695B se recoge en las fracciones posteriores. La identidad del antibiótico en las respectivas fracciones de la columna se
20 determina por cromatografía de papel y cromatografía en capa fina. Las fracciones de la columna que contienen el mismo antibiótico se combinan y evaporan a vacío para dar los respectivos antibióticos individuales en forma prácticamente pura.

25 El antibiótico A28695A se cristaliza disolviendo el antibiótico amorfo en éter caliente. El antibiótico cristaliza como sal mixta sódico-potásica con un punto de fusión de 163-165°C aproximadamente. Rendimiento: 11,8 g.

30 El antibiótico A28695B también se cristaliza de éter en forma de la sal mixta sódico-potásica, con un punto

409978

- 29 -



1

de fusión de unos 170-172°C. Rendimiento: 5,3 g.

EJEMPLO 5

Preparación de la forma ácida del antibiótico A28695A

5

Se disuelven 5 g de la sal mixta sódico-potásica de antibiótico A28695A en 105 ml de dioxano. A la solución se añaden 40 ml de agua. El pH de la solución se ajusta a 4 con ácido clorhídrico. La solución se evapora para separar el dioxano y la solución acuosa resultante se extrae dos veces con un volumen igual de acetato de etilo y se despreja la fase acuosa agotada. Se combinan los extractos en acetato de etilo y se concentran a sequedad. El residuo seco se disuelve en éter etílico caliente. La solución etérea se refrigera durante la noche para que cristalice el antibiótico A28695A. Los cristales se recuperan por filtración y se secan. Rendimiento: 4,5 g, p.f. alrededor de 97-99°C.

10

15

EJEMPLO 6

Preparación de la forma ácida del antibiótico A28695B

20

Se disuelven 100 mg de A28695B, en forma de sal mixta sódico-potásica, en 25 ml de dioxano. A la solución resultante se añaden 20 ml de agua y el pH se ajusta a 4,0 con ácido clorhídrico. La solución se concentra a vacío para separar el dioxano. La solución acuosa resultante se extrae con un volumen igual de acetato de etilo y la fase acuosa agotada se despreja. El extracto en acetato de etilo se concentra a sequedad. El residuo seco se disuelve en una cantidad mínima de éter etílico caliente. La solución etérea se mantiene en frío para permitir la cristalización de A28695B. Los cristales se recuperan por filtración y se secan. Rendimiento: 87 mg, p.f. aproximadamente 122-124°C.

25

30

409978



1

Los antibióticos A28695A y A28695B tienen la propiedad común a los ácidos orgánicos de formar sales. Son representativos de las bases inorgánicas que forman sales fisiológicamente aceptables con los antibióticos, los hidróxidos de metales alcalinos, como hidróxido de litio, hidróxido sódico e hidróxido potásico; los carbonatos y bicarbonatos de metales alcalinos como carbonato de litio y bicarbonato sódico; los hidróxidos y carbonatos de metales alcalino-térreos como hidróxido cálcico y carbonato magnésico y bases inorgánicas similares.

5

10

Son ilustrativas de las bases orgánicas que forman sales fisiológicamente aceptables con los antibióticos las alquil(inferior)aminas e hidroxialquil(inferior)aminas C_1-C_4 , primarias, secundarias y terciarias, como etilamina, isopropilamina, dietilamina, metil-n-butilamina, etanolamina y dietanolamina.

15

Las sales amónicas de A28695A y A28695B se preparan con amoniaco o hidróxido amónico.

20

Las sales de los antibióticos se preparan por los procedimientos comúnmente empleados para la obtención de sales catiónicas. Por ejemplo, la forma ácida libre del antibiótico se disuelve en un disolvente adecuado y a la solución de antibiótico se agrega una solución acuosa o en un disolvente orgánico de la base deseada. Las sales catiónicas del antibiótico pueden ser aisladas por filtración y recristalización o por evaporación del disolvente y purificación por recristalización.

25

30

Los siguientes ejemplos ilustran la preparación de sales de A28695A y A28695B.

409978

- 31 -



1

EJEMPLO 7

Preparación de la sal sódica de A28695A

5

En 10 ml de acetona se disuelven 200 mg del ácido A28695A, preparado por el procedimiento descrito en el Ejemplo 5. A la solución se añaden con agitación 5 ml de agua y el pH de la solución se ajusta a 9,0 con hidróxido sódico 1 N. La acetona se evapora lentamente colocando la solución bajo una corriente de nitrógeno. Se forma un precipitado que se recupera y disuelve en una cantidad mínima de éter dietílico. La solución se evapora a volumen reducido y se enfría a 5°C durante la noche. Los cristales resultantes se filtran y secan para dar 33 mg de sal sódica de A28695A que funde a unos 159-160°C.

10

15

EJEMPLO 8

Preparación de sal amónica de A28695A

20

En 10 ml de acetona se disuelven 200 mg de ácido A28695A, preparado por el procedimiento del Ejemplo 5, y se añaden 5 ml de agua a la solución. El pH de la solución se ajusta a 9,0 con hidróxido amónico concentrado. La acetona se evapora lentamente colocando la solución bajo una corriente de nitrógeno. Después de que la acetona se ha evaporado de la solución, se forma un precipitado no cristalino. La suspensión se extrae con un volumen igual de éter dietílico y la solución etérea resultante se concentra hasta pequeño volumen colocando la solución bajo una corriente de nitrógeno. La solución concentrada se deja en reposo a 5°C durante la noche. Se forma un precipitado cristalino que se filtra y seca para dar 120 mg de producto que funde a 124-125°C aproximadamente.

25

30



409978

EJEMPLO 9

Preparación de la sal sódica de A28695B

1 Se disuelven 200 mg de la forma ácida de A28695B, pre-
parada por el procedimiento descrito en el Ejemplo 6, en
5 10 ml de acetona y se añaden lentamente y agitando 5 ml de
agua a la solución resultante. El pH de la solución se ajusta
a 9,0 con NaOH 1 N. La acetona se evapora lentamente co-
locando la solución bajo una corriente de nitrógeno. Después
de que la acetona ha sido evaporada de la solución comienza
10 a formarse un precipitado cristalino. La suspensión se deja
en reposo a 5°C durante la noche con objeto de que la cris-
talización sea completa. Los cristales se filtran y secan
para dar 150 ml de sal sódica de A28695B que funde a unos
161-162°C.

EJEMPLO 10

Preparación de la sal amónica de A28695B

15 Se disuelven 200 mg del ácido libre A28695B, preparado
por el procedimiento descrito en el Ejemplo 6, en 10 ml de
acetona y a la solución resultante se añaden lentamente y
20 agitando 5 ml de agua. El pH de la solución se ajusta a 9,0
con solución concentrada de hidróxido amónico. La acetona
se evapora de la solución colocando esta última bajo una co-
rriente de nitrógeno. Después de que la acetona se ha evapo-
rado de la solución comienza a formarse un precipitado cris-
25 talino. La suspensión se deja en reposo a 5°C para completar
la cristalización. Los cristales de la sal amónica de
A28695B se recuperan por filtración y se secan para dar
138 mg de un producto que funde a unos 124-125°C.

30 Es sabido en la técnica farmacéutica veterinaria que la
forma salina de un antibiótico carece de trascendencia en



1975

1 el tratamiento de un animal con el mismo. Las condiciones
dentro del animal cambian frecuentemente la droga a formas
químicas distintas de las utilizadas para la administración.
Por lo tanto, la forma ácida o salina en la que pueda ser
5 administrada carece de importancia para el método de trata-
miento y puede ser seleccionada basándose en razones de eco-
nomía, comodidad y toxicidad.

La eficacia de nuestro método de modificación de la re-
lación de los ácidos grasos volátiles producidos en el rumen
10 fué demostrada mediante ensayos científicos. El método se
ensayo utilizado se describe a continuación.

EJEMPLO 11

Se obtiene el fluido del rumen de un novillo con una fís-
tula instalada quirúrgicamente que se abre al rumen. El no-
15 villo se mantiene con una ración de gran proporción de gra-
no, cuya composición es la siguiente:

	Maiz molido grosero	69,95 %
	Tusas de maiz molidas	10 %
	Harina de soja (50 % de pro- teínas)	8 %
20	Harina de alfalfa	5 %
	Melazas	5 %
	Urea	0,6 %
	Fosfato dicálcico	0,5 %
	Carbonato cálcico	0,5 %
25	Sal	0,3 %
	Premezcla de vitaminas A y D ₂	0,07 %
	Premezcla de vitamina E	0,05 %
	Premezcla de minerales traza	0,03 %

30 Una muestra del fluido del rumen se cuela a tra-
vés de cuatro capas de tela de cedazo y el eluato se recoge



MAY. 1975

409978

1 en un frasco a vacío. La materia en partículas retenida por
 el cedazo se suspende de nuevo en solución reguladora fisiológica suficiente para volver al volumen original del fluido del rumen y el eluato se cuele de nuevo. La solución reguladora utilizada se describe a continuación.

	Na_2HPO_4	0,316 g/litro
	KH_2PO_4	0,152 g/litro
	NaHCO_3	2,260 g/litro
	KCl	0,375 g/litro
10	NaCl	0,375 g/litro
	MgSO_4	0,112 g/litro
	CaCl_2	0,038 g/litro
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,008 g/litro
	MnSO_4	0,004 g/litro
15	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,004 g/litro
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,002 g/litro
	CoCl_2	0,001 g/litro

Cheng y colaboradores, J.Dairy Sci. 38, 1225 (1955).

20 Los dos eluatos se reúnen en un embudo de decantación y se dejan en reposo hasta que la materia en partículas se separa en la superficie. La capa transparente se diluye después 1:1 con la misma solución reguladora y se ajusta a pH 7,0.

25 En un matraz de 25 ml se introducen 10 ml del fluido del rumen diluido con 40 mg del mismo pienso antes citado. También se añaden 5 mg de proteína de soja por matraz. El compuesto a ensayar se pesa en cada matraz de ensayo. Se utilizan cuatro matraces repetidos por tratamiento.

30

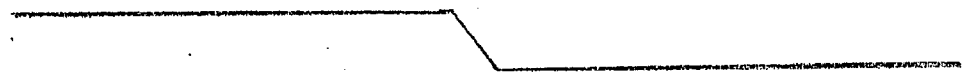


1
5
10
15
20
25
30

También se preparan dos juegos de cuatro matraces de control no tratados. Uno de los juegos de cuatro matraces se incuba durante 16 horas a 38°C junto con los matraces de ensayo. El otro juego de cuatro matraces de control no tratados son controles de tiempo cero, a los que se agregan 2 ml de ácido metafosfórico al 25 % tan pronto como se preparan los matraces para interrumpir la fermentación. La fermentación en los matraces incubados de ensayo y control se interrumpe al cabo de 16 horas mediante la adición de 2 ml de ácido metafosfórico al 25 % a cada matraz. Todas las muestras se dejan sedimentar y el líquido que sobrenada se analiza por métodos de cromatografía de gases para determinar el acetato, el propionato y el butirato.

El análisis de cada ácido graso volatilizado (AGV) encontrado en los controles de tiempo cero se sustrae de los análisis en los controles no tratados de los matraces de ensayo. Los valores resultantes reflejan la cantidad de cada AGV producido durante el periodo de fermentación de 16 horas. Se determina un valor promedio de los cuatro matraces repetidos de cada tratamiento.

Los datos dados a continuación representan la relación de los AGV producidos en los matraces tratados a los AGV producidos en los matraces de control no tratados. Este método de indicar los datos muestra con la máxima claridad los resultados de los cambios en la química del rumen producidos por nuestro método de mejora de utilización del alimento.



409978



	<u>Compuesto</u>	<u>Proporción</u>	<u>Acetato</u>	<u>Propionato</u>	<u>Butirato</u>
1	Sal mixta sódico- potásica de A28695A	25 mcg/ml	1,03	1,58	0,48
		10	0,87	1,58	0,65
		5	1,07	1,46	0,53
5		5	0,90	1,90	0,72
		1	1,07	1,30	0,64
		1	0,92	1,59	0,78
		1	0,90	1,34	1,00
		1	0,98	1,10	0,87
10		1	0,96	1,23	0,82
		1	0,98	1,41	0,66
		1	0,85	1,32	0,88
		1	0,95	1,38	0,80
		0,50	0,97	1,07	0,96
15		0,50	0,97	1,19	0,85
		0,50	1,04	1,28	0,68
		0,50	0,92	1,21	0,90
		0,25	0,96	1,15	0,99
		0,25	1,01	1,02	0,91
20		0,25	0,86	1,29	0,94
		0,25	1,04	1,21	0,74
		0,25	1,02	1,05	0,94
		0,20	0,94	1,27	0,87
	Sal mixta sódico- potásica de A28695B	25	1,21	1,18	0,61
25		10	0,53	1,76	0,85
		5	1,14	1,27	0,65
		5	0,95	1,81	0,70
		1	1,23	1,05	0,67
		1	0,98	1,51	0,76
30		0,2	0,98	1,17	0,88

409978

- 37 -



1 Los datos anteriores, habiéndose realizado múltiples ensayos a una proporción dada, pueden ser reunidos para producir los siguientes resultados medios.

Compuesto	Proporción	Acetato	Propionato	Butirato
5 Sal mixta sódico-potásica de A28695A	5 mcg/ml	0,98	1,68	0,62
	1	0,95	1,33	0,81
	0,50	0,98	1,19	0,85
	0,25	0,98	1,14	0,90
10 Sal mixta sódico-potásica de A28695B	5	1,04	1,54	0,68
	1	1,10	1,28	0,72

15 Los datos anteriores indican que, en cada ensayo individual, el nivel de propionato fué aumentado sobre el valor del control. En 19 de los 29 ensayos citados, el nivel de acetato fué reducido en comparación con el del control no tratado. El aumento en el propionato con respecto al acetato es especialmente notable en las tablas que contienen los datos reunidos, donde la variabilidad natural de los datos biológicos queda atenuada. Estas tablas indican que el tratamiento con A28695 a todas las proporciones utilizadas aumenta considerablemente el propionato con respecto al acetato en comparación con los valores de control.

20 Los niveles de butirato son reducidos uniformemente con respecto a los valores de control. Como se ha explicado, como el butirato es fabricado por el rumen a partir del acetato producido ineficientemente, la reducción en los niveles de butirato no es perjudicial para la eficacia de la alimentación.

25 Hemos encontrado que los compuestos antibióticos de nuestro método aumentan la producción de propionatos re-

30

409978

-38 -



1 pecto a la producción de acetatos en los animales rumiantes
cuando son administrados por vía oral a dichos animales. La
forma más sencilla de administrar los antibióticos consiste
en mezclarlos con el pienso de los animales.

5 Sin embargo, los compuestos antibióticos pueden
ser administrados utilmente por otras vías. Por ejemplo, pue
den ser incorporados en tabletas, purgas, bolos o cápsulas
y administrados a los animales. La formulación de los com
puestos antibióticos en estas formas de dosificación puede
10 realizarse por métodos conocidos en farmacia veterinaria.

 Las cápsulas se producen fácilmente llenando unas
cápsulas de gelatina con cualquiera de las formas deseadas
del antibiótico. Si se desea, el antibiótico puede ser di
luído con un diluyente pulverizado inerte, como azúcar, al
15 midón o celulosa cristalina purificada, con objeto de aumen
tar su volumen para mayor comodidad de llenado de las cáps
ulas.

 Las tabletas de los antibióticos de nuestro méto
do se preparan por procedimientos farmacéuticos convenciona
20 les. La manufactura de las tabletas es una técnica muy cono
cida y muy avanzada. Además del ingrediente activo, una ta
bleta habitualmente contiene una base, un desintegrante, un
absorbente, un aglutinante y un lubricante. Las bases típicas
son lactosa, azúcar glas fina, cloruro sódico, almidón y ma
25 nitol. El almidón también es un buen desintegrante así como
el ácido algínico. Algunas veces se utilizan agentes tenso
activos como laurilsulfato sódico y dioctilsulfosuccinato
sódico. Los absorbentes comúnmente utilizados son, de nuevo,
almidón y lactosa mientras que el carbonato magnésico tam
30 bién es útil para las sustancias oleosas. Los aglutinantes

409978

-39 -



1 frecuentemente utilizados son gelatina, gomas, almidón,
dextrina y varios derivados de celulosa. Entre los lubrican-
tes comúnmente utilizados se encuentran el estearato magné-
sico, talco, parafina, varios jabones metálicos y polieti-
5 lenglicol.

Nuestro método también puede ser practicado para
la administración del compuesto antibiótico como bolo de li-
beración lenta. Estos bolos se preparan como tabletas a ex-
cepción de que se utiliza un medio para retrasar la disolu-
10 ción del antibiótico. Los bolos se preparan de manera que
liberen el producto durante largos periodos. La disolución
lenta es favorecida seleccionando una forma altamente inso-
luble en agua del antibiótico. Se agrega una sustancia co-
mo limaduras de hierro para aumentar la densidad del bolo
15 y mantenerlo estático en el fondo del rumen.

La disolución del antibiótico se retrasa median-
te el uso de una matriz de materiales insolubles en los que
se impregna la droga. Por ejemplo, son útiles las sustan-
20 cias como ceras vegetales, ceras minerales purificadas y
materiales poliméricos insolubles en agua.

Las purgas de nuestros antibióticos se preparan
con la máxima facilidad seleccionando una forma soluble en
agua del antibiótico. Si se desea una forma insoluble por
25 alguna razón, puede prepararse una suspensión. Alternativa-
mente, la purga puede formularse como solución en un disol-
vente fisiológicamente aceptable, como polietilenglicol.

Las suspensiones de formas insolubles de nuestros
antibióticos pueden ser preparadas en no disolventes como
30 aceites vegetales como el de cacahuet, maíz o sésamo; en un

409978

- 40 -



1 glicol como propilenglicol o polietilenglicol o en agua, se-
gún la forma del antibiótico seleccionado.

5 Son necesarios coadyuvantes adecuados, fisiológi-
camente aceptables, para mantener el antibiótico en suspen-
sión. Los coadyuvantes pueden ser seleccionados entre los
espesantes, como carboximetilcelulosa, polivinilpirrolido-
na, gelatina y los alginatos. Muchas clases de agentes ten-
soactivos sirven para suspender los antibióticos. Por ejem-
10 plo, la lecitina, los aductos de alquilfenol y óxido de po-
lietileno, los naftalensulfonatos, alquilbenzosulfonatos y
ésteres de polioxietilensorbitano son útiles para formar
suspensiones en líquidos no disolventes.

15 Además, en algunos casos individuales, muchas sus-
tancias que afectan a la hidrofiliidad, a la densidad y a
la tensión superficial del líquido pueden favorecer la for-
mación de suspensiones. Por ejemplo, los antiespumantes de
silicona, glicoles, el sorbitol y los azúcares pueden ser
agentes de suspensión útiles.

20 El antibiótico suspendible puede ser ofrecido al
ganadero en forma de suspensión o como mezcla seca del anti-
biótico y de los coadyuvantes para ser diluída antes de su
uso.

25 Nuestros antibióticos también pueden ser adminis-
trados en el agua de bebida de los rumiantes. La incorpora-
ción al agua de bebida se realiza agregando una forma solu-
ble o suspendible en agua del antibiótico deseado al agua
en la cantidad apropiada. La formulación del antibiótico
para la adición al agua de bebida se basa en los mismos prin-
30 cipios que la formulación de purgas.

409978⁴¹⁻

23



1

Los máximos beneficios de nuestro método se obtienen mediante la administración continua del A28695 a los animales. Por lo tanto, la forma más práctica de administrarlo es en forma de nuestras composiciones de piensos mejoradas que contienen A28695.

5

Nuestras composiciones de piensos son nuevas debido a la presencia del A28695; los piensos animales sobre los que se basan las composiciones pueden ser cualquiera de los piensos adecuados para la nutrición de rumiantes con una función del rumen desarrollada.

10

La formulación apropiada de los piensos para animales que suplen las necesidades nutritivas de los animales rumiantes es una técnica extraordinariamente bien conocida y complicada. Los expertos poseen experiencia en la formulación de piensos que nutren a los animales y que aprovechan la situación económica en cada área individual y son capaces de formular piensos sin más indicaciones. Estos piensos, en general, comprenden hidratos de carbono, proteínas, fuentes de forraje basto y sales inorgánicas. En algunos casos, también se agregan al pienso pequeñas cantidades de sustancias que afectan al desarrollo como vitaminas y minerales traza.

15

20

Los siguientes ejemplos de formulaciones de piensos para animales rumiantes se dan solamente con fines ilustrativos de las formulaciones típicas.

25

EJEMPLO 12

Ración para el engorde de corderos, al 45 % de forraje basto

	<u>%</u>
Maiz amarillo	39,00
Paja de alfalfa	45,00

30

23 MAY



409978

1		<u>%</u>
	Melazas de caña	10,00
	Harina de soja	5,00
	Fosfato dicálcico	0,50
5	Sal	0,35
	Premezclas de minerales trazas y vitaminas	<u>0,15</u>
		100,00

EJEMPLO 14

Ración de engorde de corderos, al 20 % de forraje basto

10	Maiz amarillo	50,00
	Pulpa de remolacha azucarera	15,00
	Paja de alfalfa	20,00
	Melaza de caña	9,00
	Harina de soja	5,00
15	Fosfato dicálcico	0,50
	Sal	0,35
	Premezclas de minerales trazas y vitaminas	<u>0,15</u>
		100,00

EJEMPLO 14

Ración para el crecimiento o hibernación del ganado vacuno,

alta en forraje basto

20	Maíz de silo, bien granado, 50 % de materia seca	68,00 (% de materia seca)
	Paja de trigo molida	20,00
25	Harina de soja	10,00
	Fosfato dicálcico	0,75
	Piedra caliza molida	0,50
	Sal	0,50
30	Premezclas de minerales trazas y vitaminas	<u>0,25</u>
		100,00

409978

23 MAY.



1

EJEMPLO 15

Ración de engorde de ganado vacuno, al 10 % de forraje basto

5

Cebada	76,00
Cáscaras de semilla de algodón	10,00
Harina de semilla de algodón	8,00
Grasa animal	4,00
Fosfato dicálcico	0,50
Piedra caliza molida	0,75
Sal	0,50
Premezclas de minerales trazas y vitaminas	<u>0,25</u>

10

100,00

15

Nuestras composiciones mejoradas para piensos contienen por lo menos una concentración de A28695 que afecte al rumen. La concentración que afecta al rumen es aquella que proporciona al animal una dosis que afecta al rumen cuando aquél consume su ración diaria regular de pienso. Naturalmente, la concentración que afecta al rumen varía con el peso del animal y con la cantidad de pienso que consume diariamente. Habitualmente, la concentración que afecta al rumen está comprendida aproximadamente entre 2 g por tonelada de pienso y unos 200 g de A28695 por tonelada de pienso. La gama preferida de concentraciones de A28695 es alrededor de 5 g a 100 g por tonelada de pienso. Las concentraciones de A28695 dentro de estos intervalos proporcionan unas cantidades generalmente efectivas de A28695 a los animales tratados. Sin embargo, los expertos en la técnica observarán que, en casos especiales, por ejemplo cuando los animales en tratamiento están consumiendo unas cantidades excepcionalmente pequeñas o excepcionalmente grandes de pienso en

20

25

30

409978

- 44 -



1 relación con su peso, pueden ser apropiadas unas concentra-
ciones no comprendidas dentro de los intervalos establecidos.

5 Los métodos de formulación de los antibióticos en
piensos para animales son muy conocidos. Es habitual prepa-
rar una premezcla de droga concentrada como materia prima
para los piensos medicados. Las propiedades de la premezcla
son incorporadas a las propiedades del pienso que se prepara
a partir de aquélla. Por lo tanto, la formulación de la pre-
mezcla se basa exclusivamente en la comodidad de obtención
10 del pienso a partir de aquélla y en factores económicos. La
naturaleza del ingrediente activo de la premezcla y la ac-
ción biológica de dicho ingrediente activo son independien-
tes de la formulación. La premezcla puede contener alrededor
de 1 a 400 g/libra (871 g/kg) de A28695, según la convenien-
15 cia en la mezcla del pienso que contiene la concentración
deseada de A28695. Las premezclas pueden ser líquidas o só-
lidas.

20 Nuestras premezclas mejoradas para piensos, que son
nuevas debidas a la presencia de nuestro antibiótico A28695,
se formulan en cualquiera de los vehículos convencionalmente
utilizados y fisiológicamente aceptables. Los vehículos lí-
quidos que son adecuados para uso en las premezclas son los
glicoles como polietilenglicoles de varios pesos moleculares
y propilenglicol, aceites inertes como aceites vegetales y
25 aceites minerales muy refinados y alcoholes fisiológicamente
aceptables como etanol. El agua o el alcohol acuoso constitu-
yen un vehículo líquido eficaz para la premezcla para muchas
de las formas de A28695. Los vehículos sólidos de las premez-
clas comprenden vermiculita, tierra de diatomeas, arcillas
30 fisiológicamente aceptables como atapulgita y montmorillonita

409978

- 45 -



1 y componentes para piensos granulados o pulverizados como
maiz machacado, harina de soja, harina de alfalfa, cascari-
lla de arroz, tusas de maíz, trigo y avena machacados y ma-
teriales de desecho del procesado de granos.

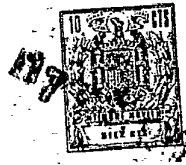
5 Todos los métodos de formulación, mezclado y granula-
ción de los piensos normalmente utilizados en la fabrica-
ción de piensos para rumiantes son totalmente apropiados
para la manufactura de los piensos que contienen los com-
puestos antibióticos de nuestro método.

10 Es habitual tratar los animales económicos, incluidos
los rumiantes, con diversos promotores del crecimiento, pre-
ventivos de las enfermedades y tratamientos de las enferme-
dades durante todas sus vidas. Con frecuencia estas drogas
se utilizan en combinación. Nuestro método puede ser puesto
15 en práctica en combinación con otros tratamientos.

Como se ha demostrado, la administración oral del
A28695 altera beneficiosamente la producción de propiona-
tos en relación con la producción de acetatos en el rumen.
El mismo tratamiento beneficia también a los animales mono-
20 gástricos que fermentan la materia vegetal fibrosa en el
ciego. Los animales monogástricos aquí citados son aquellos
que consumen piensos vegetales fibrosos y los disuelven por
lo menos en parte por fermentación microbiológica en el cie-
go. La fermentación cecal sigue una trayectoria química
25 similar a la fermentación en el rumen.

Los caballos, cerdos y conejos son animales ilustra-
tivos que digieren una parte de su alimento por fermenta-
ción cecal. La utilización global del alimento de estos ani-
males es aumentada por la administración oral de A28695 a
30

409978



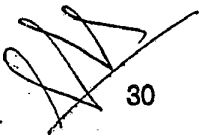
1 través de un cambio beneficioso en la relación propionato/
acetato. Los conejos y caballos son ilustrativos de los ani-
males en los que la fermentación cecal constituye una parte
importante del proceso digestivo total en los que, por con-
5 siguiente, el A28695 es especialmente beneficioso.

En resumen, la Patente de Invención que se soli-
cita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

10 1. Método para la producción de antibióticos
no nitrogenados ácidos, el antibiótico A28695 tal y como
está definido anteriormente y el antibiótico A28695B tal y
como está definido anteriormente, caracterizado por culti-
var Streptomyces albus NRRL 3883 en un medio de cultivo nu-
15 tritivo que contiene fuentes asimilables de carbono, nitró-
geno y sales inorgánicas bajo condiciones de fermentación
aerobia sumergida a una temperatura de 26° a 40°C hasta que
se haya producido una cantidad sustancial de los antibióticos
A28695A y A28695B por dicho organismo en dicho medio de cul-
20 tivo, recuperar una mezcla de los citados antibióticos a
partir del medio de cultivo y, si se desea, separar los anti-
bióticos individuales A28695A y A28695B de la mezcla de anti-
bióticos recuperada.

25 2. Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
" METODO PARA LA PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS NO NITROGENADOS
ACIDOS ".


30

409978

- 47 -



1

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de cuarenta y siete páginas mecanografiadas y dibujos adjuntos.

Madrid, 22 de diciembre 1.972

5

BERNARDO UNGRIA

P.P.
[Handwritten signature]

10

15

20

25

[Handwritten signature]
30

409978

A 28695 A



409978

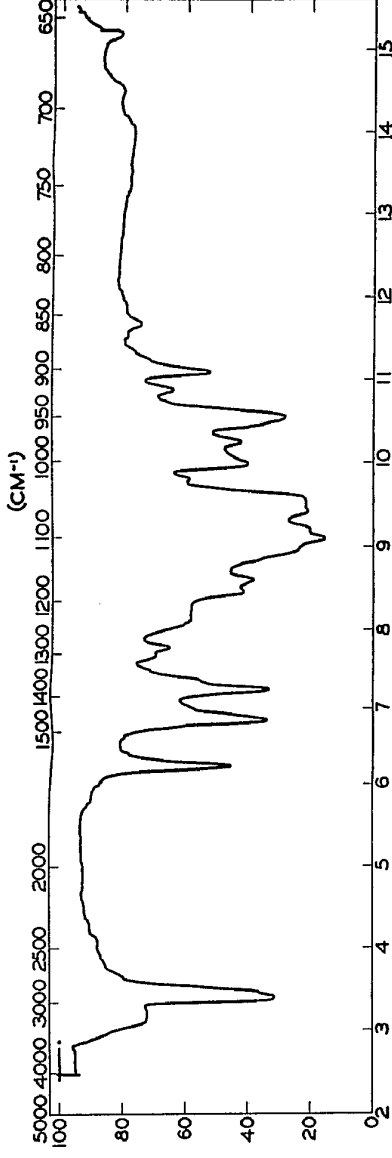


FIG. 1

A 28695 B

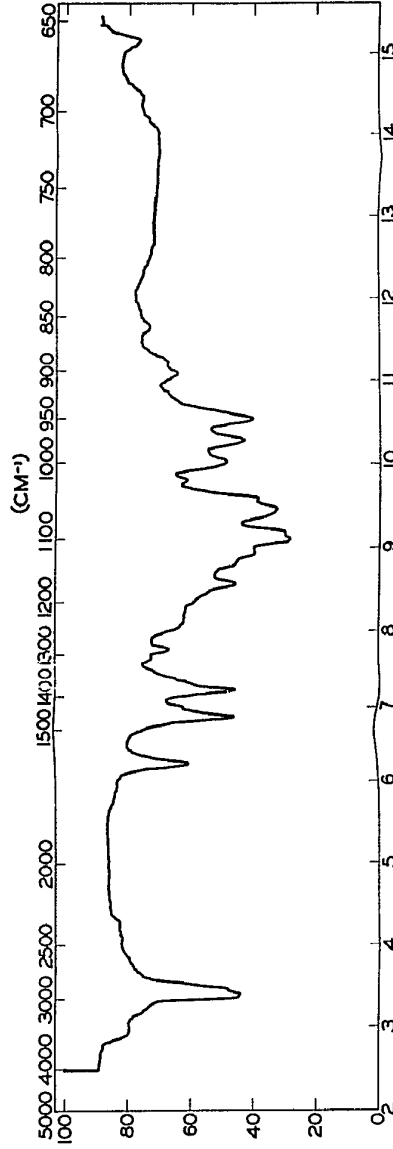


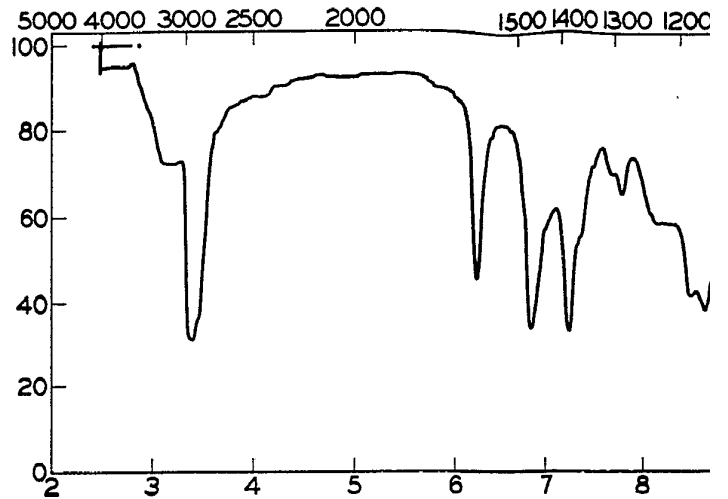
FIG. 2

ESCALA VARIABLE
 Madrid, 22 de diciembre de 1972
 BERNARDO UNGRIA
 P.P.

409978

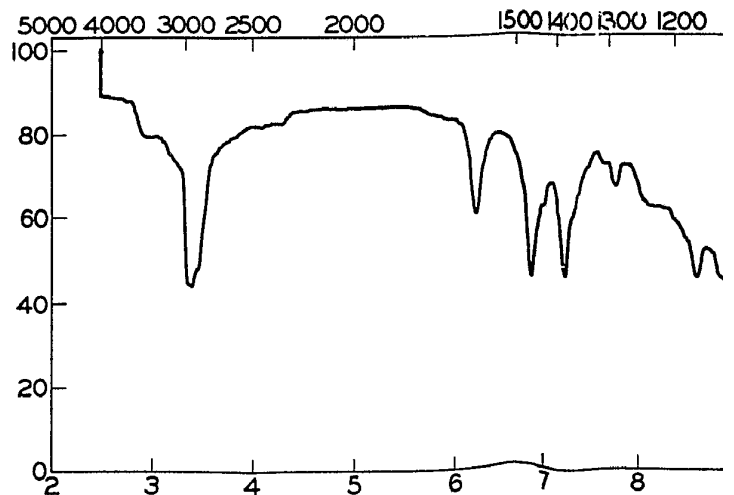
A 28695 A

FIG. 1



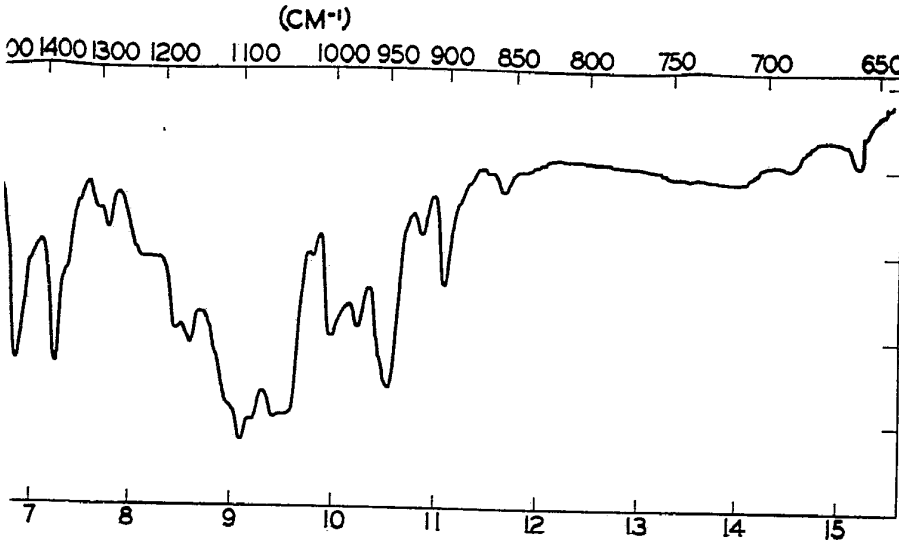
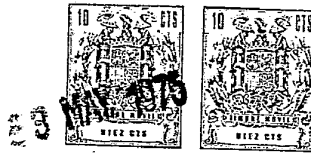
A 28695 B

FIG. 2



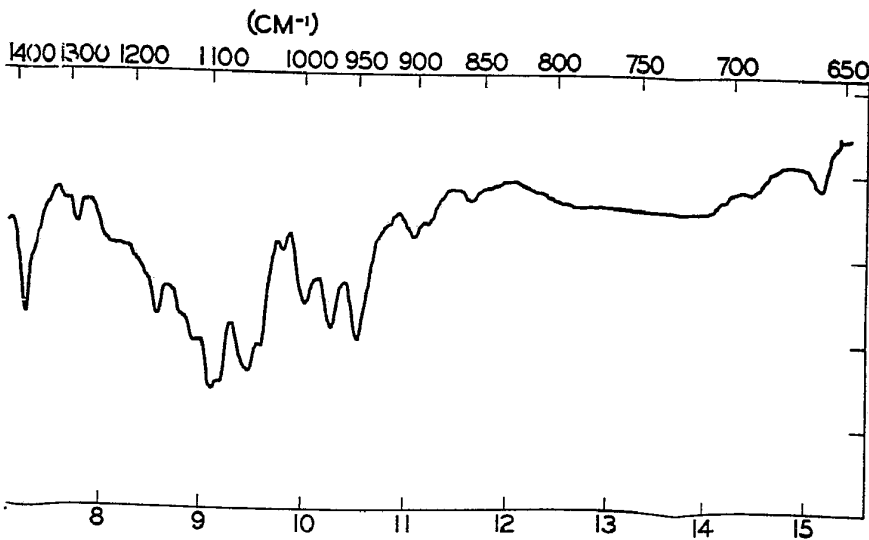
20 MAY 1972

695 A



409978

5 B



ESCALA VARIABLE
Madrid, 22 de diciembre de 1972
BERNARDO UNGRIA
p.p.