

422834



No 422.834

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 46206, U.S.A.

ENUNCIADO: " UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION
DEL METABOLITO A-27106 "

Prioridad: Patente estadounidense n.º 328.586 del 1-2-1973

FC 26-3-76

e12B/A23K

422834

- 2 -



1 Esta invención se refiere a un procedimiento para la preparación del metabolito A-27106 a partir de monensina por fermentación en cultivo sumergido de S. candidus NRRL 5449.

5 La invención se refiere además a un método de control de la coccidiosis en el ganado aviar y a un método de aumento de la eficacia de la utilización del pienso en los animales rumiantes.

10 La invención proporciona un procedimiento para la preparación del metabolito A-27106, o las formas ácida, amónica, lítica, potásica, rubídica o césica del mismo, metabolito que es un sólido cristalino blanco, relativamente soluble en los alcanos inferiores, pero generalmente insoluble en los alcoholes inferiores y que tiene:

- 15 a) un peso molecular de 854, determinado por espectrometría de masas;
- b) una composición elemental aproximada de 58,78 % de carbono, 8,51 % de hidrógeno, 27,85 % de oxígeno y 3,63 % de sodio;
- 20 c) una fórmula empírica de $C_{42}H_{71}O_{16}Na$;
- d) un espectro de absorción infrarrojo en cloroformo como el mostrado en el dibujo que acompaña a esta memoria;
- e) un espectro de masas que presenta un pico de ión molecular a m/e 854,44630 y picos característicos a m/e 836,44129, 779,44690 y 761,44740 y
- 25 f) un valor Rf de 0,49 por cromatografía en capa fina de gel de sílice en benceno-metanol (7:3) y

30 cuya forma ácida es un sólido blanco con un peso molecular de 832 aproximadamente y un grupo valorable con un valor del pKa de 7,2, por cultivo de Streptomyces candidus NRRL 5449 en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de carbono,

422834

- 3 -



1 nitrógeno y sales inorgánicas, en condiciones aerobias sumergidas, en presencia de glucosa y monensina, hasta que esta última ha sido convertida en una cantidad sustancial del metabolito A-27106 por el organismo del medio de cultivo.

5 La invención proporciona además un método para evitar o tratar la coccidiosis en el ganado aviar por administración al mismo de una cantidad efectiva de una composición que contiene el metabolito A-27106 y un vehículo fisiológicamente aceptable y a un método para aumentar la eficiencia de la utilización del pienso por los animales rumiantes con una función rumiante desarrollada, mediante la administración oral a tales animales de una cantidad aumentadora del propionato de metabolito A-27106.

10

15 La coccidiosis es una enfermedad protozoaria muy conocida resultante de la infección por una o más especies de Eimeria o Isospora (para un resumen, véase Lund y Farr en "Diseases of Poultry", 5ª edición, Biester and Schwarte, Eds., Iowa State University Press, Ames, Ia, págs. 1056-1096). A la vista de las grandes pérdidas económicas que causa la coccidiosis y las dificultades inherentes al uso de algunos coccidiostatos conocidos, continúa la búsqueda de mejores coccidiostatos.

20

25 Como los rumiantes son animales de importancia económica, es muy interesante aumentar la eficacia de utilización de los piensos por los rumiantes. El mecanismo de la utilización de la porción nutritiva fundamental (hidratos de carbono) del pienso de los rumiantes es muy conocido. Los microorganismos que se encuentran en el rumen del animal fermentan los hidratos de carbono para producir monosacáridos y después degradan estos monosacáridos a compuestos pirúvicos.

30

422834

- 4 -



1 Los piruvatos son metabolizados por procesos microbiológicos
para formar acetatos, butiratos o propionatos, colectivamente
conocidos por ácidos grasos volátiles (AGV).

5 La eficacia relativa de utilización de los AGV ha
sido discutida por McCullough, Feedstuffs, 19 de Junio de
1971, pág. 19; Eskeland y colaboradores, J.An.Sci. 33, 282
(1971) y Church y colaboradores, "Digestive Physiology and
10 Nutrition of Ruminants", Vol. 2, 1971, págs. 622 y 625. Aun-
que se utilizan acetatos y butiratos, los propionatos se uti-
lizan con una eficacia relativamente mayor. Además, cuando la
cantidad de propionato es demasiado pequeña, los animales
pueden padecer de cetosis. Por lo tanto, una droga beneficio-
sa estimula a los animales a producir propionatos a partir de
15 los hidratos de carbono, aumentando con ello la eficacia de
utilización de los hidratos de carbono y también reduciendo
los casos de cetosis.

La monensina, a partir de la cual puede prepararse
el metabolito A-27106, está descrita en la patente estado-
unidense 3.501.568 como factor A del complejo antibiótico
20 A 3823. La monensina es también un agente anticoccidial.

El agente biológicamente activo de este procedi-
miento es denominado arbitrariamente metabolito A-27106. La
expresión "A-27106" en el sentido utilizado aquí se refiere
a la sal sódica. Otras sales son las de amonio, litio, pota-
25 sio, rubidio y cesio así como la forma ácida.

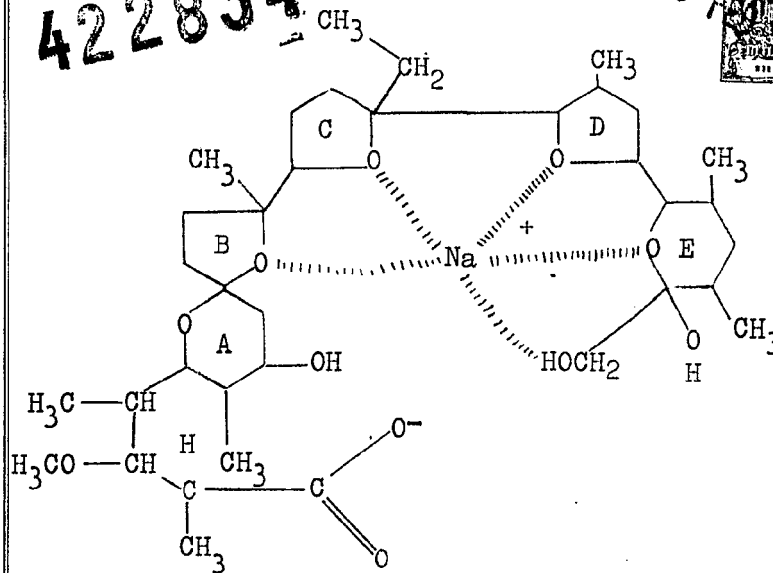
Un material de partida en la preparación del meta-
bolito A-27106 es la monensina, cuya sal sódica responde a
la fórmula:

30

422834

- 5 -

26



Fórmula I

La monensina en su forma sódica es producida por el Streptomyces cinnamomensis como se describe en la patente estadounidense 3.501.568.

El metabolito A-27106 se produce a partir de monensina o del cultivo micelial en el cual se produce la monensina, en presencia de glucosa, por un enzima o enzimas elaborados por una nueva cepa de Streptomyces candidus. Un cultivo de esta nueva cepa ha sido depositado, sin restricciones en cuanto a su disponibilidad, en la colección de cultivos permanentes de la Northern Utilization Research and Development Division, Agricultural Research Service, Departamento de Agricultura de Estados Unidos, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, donde se le ha atribuido el número de accesoión NRRL 5449.

Debido a la incertidumbre de los estudios taxonómicos con el grupo Streptomyces de organismos, siempre existe un elemento de duda asociado a la clasificación de un organismo recién descubierto. En las características más importantes, sin embargo, el organismo NRRL 5449 que convierte la monensina en el metabolito A-27106 al que más se parece apa-

422834

- 6 -

26



1 rentemente es al Streptomyces candidus (Krassilnikov) Waksman
1953. El cultivo tipo ha sido descrito por S.A. Waksman en
"The Actinomycetes" Vol. II, Williams y Wilkins, Baltimore,
1961, pág. 187. El organismo tipo también está depositado en
5 el Institute of Microbiology of Rutgers University, New
Brunswick, N.J., bajo el número de accesión IMRU 3416. Este
organismo se considera una nueva cepa del organismo descrito.
Aunque el S. candidus NRRL 5449 y la cepa conocida se parecen
entre sí en su morfología y color miceliales generales y en
10 el aspecto de las esporas, existen diferencias suficientes
entre ellos para requerir que el organismo aquí descrito sea
caracterizado como una nueva cepa. Por ejemplo, el organismo
publicado no coagula la leche y licúa a la gelatina lentamente,
mientras que la nueva cepa forma cuajada al cabo de 14
15 días y no licúa a la gelatina en 21 días. Lo que es más impor-
tante, un cultivo de muestra preparado a partir de la cepa
IMRU 3416 no convierte la monensina en el metabolito A-27106.

El organismo que convierte la monensina en el me-
tabolito A-27106 fué aislado de una muestra de tierra reco-
20 gida en el Monte Ararat, Turquía, suspendiendo porciones de
la tierra en agua destilada estéril y formando una banda de
la suspensión sobre ágar nutritivo. Las placas de ágar sem-
bradas fueron incubadas a 25-35°C hasta que se observaron
colonias visibles. Al final del periodo de incubación, las
25 colonias de organismos seleccionados fueron transferidas me-
diante un aro de platino estéril a tubos inclinados de ágar.
Uno de los tubos fué incubado después para conseguir cantida-
des adecuadas de inoculum del organismo NRRL 5449.

30 Se realizaron estudios taxonómicos del S. candidus
NRRL 5449 utilizando los métodos recomendados por el Interna-

422834



1 tional Cooperative Project for Description and Deposition of
Streptomyces, de acuerdo con los procedimientos descritos por
Shirling y Gottlieb, "Methods for Characterization of Strep-
5 tomyces Species", International Bulletin of Systematic Bacte-
riology 16, 313-340 (1966), junto con otros ensayos suplemen-
tarios. El prefijo "ICP" se refiere a los medios descritos
por Shirling y Gottlieb. Los medios restantes son descritos
por Waksman, en la obra citada. Los nombres de los colores
10 fueron atribuidos de acuerdo con Kelly y Judd en "The ISCC-
NBS Method of Designating Colors and a Dictionary of Color
Names", Departamento de Comercio de Estados Unidos, Circular
553, 1955. Las cifras entre paréntesis se refieren a la serie
de colores de Tresner y Backus, "System of Color Wheels for
Streptomyces Taxonomy", Appl. Microbiol. 11, 335 (1963). Las
15 designaciones de los colores tabulados están subrayadas y los
bloques de color de Maerz y Paul ("Dictionary of Color",
McGraw-Hill, N.Y., 1950) están entre corchetes.

20 El Streptomycete NRRL 5449 se caracteriza por unos
esporoforos entre lineales y ondulados y unas esporas entre
ovales y ligeramente cilíndricas, con un promedio de $1,165 \mu \times$
 $0,57 \mu$, en cadenas de 10 a 50. Las esporas son lisas cuando
se observan por microscopía electrónica. Los micelios aéreos
son habitualmente blancos. A 26°C solamente se produce un
desarrollo vegetativo y a 45°C no se produce desarrollo. El
25 desarrollo y la esporulación máximos se producen entre 30 y
 37°C .

30 De acuerdo con la práctica habitual, el desarrollo
del microorganismo NRRL 5449 fué estudiado sobre diversos me-
dios que son aceptados para el estudio del Actinomycetes. Los
procesos de cultivo eran uniformes y comunes. Los medios em-

422834

- 8 -



- 1 pleados y las características de cultivo observadas están in-
dicados a continuación:
- ICP 1 Crecimiento mediano; reverso amarillo pálido [11C1];
ningún micelio aéreo ni esporas; sin pigmento soluble.
- 5 ICP 2 Crecimiento abundante; reverso amarillo pálido [10J3];
micelios aéreos y esporas abundantes; (W) blanco a; sin
pigmento soluble.
- ICP 3 Buen crecimiento; reverso verde amarillento pálido
[10C1]; buen micelio aéreo y esporas; (W) blanco a; sin
10 pigmento soluble.
- ICP 4 Crecimiento bueno a abundante; reverso amarillo modera-
do [10H4]; micelio aéreo y esporas entre bueno y abun-
dante; (W) blanco a; pigmento soluble marrón.
- ICP 5 Crecimiento abundante; reverso amarillo anaranjado mode-
15 rado [10I6]; micelio aéreo y esporas abundantes; (Y)
amarillo pálido 2db; ligero pigmento soluble marrón.
- ICP 7 Buen crecimiento; reverso amarillo verdoso pálido [10B];
buen micelio aéreo y esporas; (W) blanco a; sin pigmen-
to soluble.
- 20 Glicerol-glicina. Crecimiento abundante; reverso marrón medio
[11J4]; esporulación y micelio aéreo abundantes; (W)
blanco a y (Y) amarillo pálido 2db; ligero pigmento so-
luble marrón pálido.
- Medio de Emerson. Crecimiento abundante; reverso amarillo gri-
25 sáceo [12H3]; sin micelio aéreo ni esporas; sin pigmen-
to soluble.
- Medio de Bennett Buen crecimiento; reverso amarillo pálido
[11I2]; micelio aéreo y esporas escasos; (W) blanco a;
sin pigmento soluble
- 30 Medio de Czapek Crecimiento abundante; amarillo naranja mode-

422834



1 rado [11J7]; micelio aéreo y esporas abundantes; (W) blanco a; sin pigmento soluble.

Glucosa-asparagina Crecimiento regular a bueno; reverso verde amarillento pálido [10B1]; sin micelio aéreo ni esporas; sin pigmento soluble.

5

Malato cálcico Crecimiento abundante; reverso amarillo grisáceo [11E4]; micelio aéreo y esporas abundantes; (Y) amarillo pálido 2ba; ligero pigmento soluble marrón.

10

Agar nutritivo Buen crecimiento; reverso verde amarillento pálido [10C1]; sin micelio aéreo ni esporas; sin pigmento soluble.

15

El organismo fué estudiado para determinar propiedades fisiológicas escogidas de acuerdo con procedimientos normales. Las propiedades observadas y las características en contradas fueron las siguientes:

20

<u>Propiedad observada</u>	<u>Características</u>
Acción sobre la leche descremada	Clarificación; cuajada al cabo de 14 días
Reducción de nitratos	Positiva
Producción de melanina, caldo de triptona-extracto de levadura	Ligera
ágar Tyrosina	Ninguna
Licuefacción de gelatina	Ninguna al cabo de 21 días
Requisitos de temperatura	26°C - crecimiento vegetativo solamente 30-37°C - buen crecimiento vegetativo; buen micelio aéreo y esporas 43-55°C - crecimiento nulo.

25

30

Los resultados de los ensayos de utilización de carbono realizados con el organismo NRRL 5449 están indicados a continuación. Los símbolos empleados para indicar la respuesta de crecimiento son:

422834

- 10 -



- 1 + = Utilización - buen crecimiento
 [+] = Probable utilización - crecimiento entre pobre y regular
 [-] = Utilización cuestionable - poco o ningún crecimiento
 5 - = Utilización nula - sin crecimiento.

	<u>Fuente de carbono</u>	<u>Respuesta</u>
	Rafinosa	+
	D-fructosa	[+]
	Celobiosa	[+]
10	L-arabinosa	[+]
	D-manitol	[+]
	Ramnosa	[+]
	Celolusa	-
	Dextrosa	[+] a [-]
15	D-xilosa	[+]
	Inositol	+
	-C (sin hidratos de carbono)	[-] a [+]

20 El medio de cultivo empleado para desarrollar el S. candidus NRRL 5449 puede ser cualquiera de diversos medios. Sin embargo, por razones de economía de producción, de rendimientos óptimos y facilidad de aislamiento del producto, se prefieren ciertos medios de cultivo. Así, por ejemplo, entre las fuentes preferidas de hidratos de carbono en la fermentación a gran escala se encuentran el azúcar invertido o el jarabe de maíz, aunque también puede emplearse la glucosa, fructosa, maltosa, almidón, inositol y similares. Cuando la monensina ha de ser convertida en el metabolito A-27106 en el cultivo de fermentación al mismo tiempo que se está desarrollando el S. candidus NRRL 5449, el medio debe contener una fuente de glucosa para conseguir una conversión eficiente. Cuando

25

30

422834

- 11 -



1 el S.candidus NRRL 5449 se cultiva para producir su sistema
enzimático que será utilizado posteriormente en la conversión
de la monensina en el metabolito A-27106, la presencia de glu
5 cosa durante la fermentación es opcional. Las fuentes prefe-
ridas de nitrógeno son las peptonas, la harina de soja, las
mezclas de aminoácidos y similares. Entre las sales inorgáni-
cas nutrientes que pueden ser incorporadas a los medios de
cultivo se encuentran las sales solubles habituales capaces
de formar iones hierro, sodio, potasio, amonio, calcio, fos-
10 fato, cloruro, carbonato y similares.

Los elementos traza esenciales, necesarios para el
crecimiento y desarrollo del organismo, también deben incluir-
se en el medio de cultivo. Estos elementos traza comúnmente
aparecen como impurezas de los otros constituyentes del medio,
15 en cantidades suficientes para cumplir los requisitos de cre-
cimiento del organismo.

El pH inicial del medio de cultivo puede ser varia-
do. Antes de la inoculación con el organismo, sin embargo,
es deseable ajustar el pH del medio de cultivo a un valor
20 comprendido entre 5,7 y 7,5 aproximadamente, según el medio
particular empleado. Como ocurre con otros actinomycetes, el
medio gradualmente se vuelve más alcalino a medida que trans-
curre la fermentación y puede ascender desde un pH inicial
de 5,9 aproximadamente hasta un pH de 6,9 o más alto durante
25 el periodo de crecimiento del organismo. El pH final es con-
trolado, por lo menos en parte, por el pH inicial del medio,
por los reguladores presentes en el medio y por la duración
del tiempo durante el cual se permite crecer al organismo.
Aunque el pH puede ser ajustado por adición de un ácido o una
30 base, se han conseguido buenos resultados sin ningún ajuste

422834



1 del pH.

5 En común con otras especies de Streptomyces, el organismo NRRL 5449 requiere condiciones de crecimiento aerobias. La propagación en un volumen pequeño se realiza convenientemente sobre tubos inclinados o placas de ágar, en matra-

10 El medio de fermentación en un tanque estéril puede ser inoculado con una suspensión esporulada para iniciar la fermentación. Sin embargo, como la inoculación con una suspensión esporulada supone un retraso del crecimiento, es preferible un inoculum vegetativo. Este último se prepara inoculando un pequeño volumen de medio de cultivo con la forma esporulada o con fragmentos de micelio del organismo para obtener un cultivo fresco y de crecimiento activo del organismo.

15 El inoculum vegetativo se transfiere después a un tanque mayor. El medio utilizado para el crecimiento del inoculum vegetativo puede ser el mismo utilizado para la producción a gran escala, pero también pueden emplearse otros medios.

20 El organismo S. candidus NRRL 5449 crecerá dentro de un intervalo de temperatura comprendido aproximadamente entre 26° y 40°C. Sin embargo, el crecimiento y la esporulación máximos se producen entre unos 32 y 37°C.

25 Como es costumbre en los procesos de cultivo sumergido aerobio, se hace pasar aire estéril a través del medio de cultivo durante la fermentación. Para un crecimiento del organismo y una producción del metabolito A-27106 eficientes, el volumen de aire empleado en la producción en tanque de la sustancia debe ser superior a alrededor de 0,1 volúmenes de

30 aire por minuto y por volumen de medio de cultivo. Los rendi-

422834

- 13 -

20



1 mientos óptimos se obtienen cuando el volumen de aire utilizado es como mínimo de la tercera parte a la mitad del volumen de aire por minuto y por volumen de medio de cultivo.

5 El tiempo de fermentación necesario para convertir la monensina en metabolito A-27106 es variable. La presencia de una cantidad adecuada de glucosa es esencial para la conversión de la monensina en el metabolito A-27106. En general, cuando se encuentra presente glucosa en cantidades adecuadas y la monensina está presente en una proporción del orden de
10 0,1 a 1,0 gramos por litro de medio, la conversión de monensina en metabolito A-27106 es prácticamente completa en unas 36 a 72 horas. La conversión óptima se produce cuando la monensina está presente en una proporción de 0,5 a 0,7 gramos por litro de medio. Una cantidad adecuada de glucosa es alrededor de 2,0 a 2,5 % en peso del medio. Para comprobar los
15 niveles de concentración puede utilizarse un papel de ensayo sensible a la glucosa. Cuando el contenido de glucosa descien- de por debajo de alrededor del 2 %, debe agregarse glucosa para mantener la concentración en los niveles óptimos.

20 Cuando se utiliza el sistema enzimático del S. candidus para efectuar la conversión de la monensina en el metabolito A-27106, no es esencial que el preparado enzimático esté muy purificado. Por ejemplo, el caldo de fermentación filtrado puede ser liofilizado y almacenado por lo menos hasta
25 2 semanas antes de reconstituirlo con una solución acuosa reguladora, utilizando aproximadamente un sexto del volumen del caldo original. La conversión eficiente se consigue al cabo de unas 72 horas cuando se reconstituyen 2,5 g de este preparado liofilizado en presencia de 25 mg de monensina.

30 El sistema enzimático activo está presente tanto

422834

- 14 -



1 en el caldo filtrado como en las células. Puede obtenerse un
preparado enzimático de mayor pureza a partir de las células
de fermentación separadas. Estas células pueden ser congela-
das y almacenadas durante periodos de tiempo de 3 meses como
5 mínimo. Las células descongeladas pueden ser después reconsti-
tuídas suspendiéndolas en una solución reguladora. La sus-
pensión regulada es purificada de nuevo por sonicación y
centrifugación. Los residuos celulares purificados así sepa-
rados se vuelven a suspender en solución reguladora y se dia-
10 lizan. Empleando este método, 200 g de células procedentes
del medio de fermentación dan un dializado purificado sufi-
ciente para convertir la glucosa y 25 mg de monensina en me-
tabolito A-27106.

15 El progreso de la conversión puede ser vigilado
por cromatografía en capa fina (ccf). Sobre gel de sílice
(F-254, E-N Laboratories, Inc., Elmsford, N.Y.) en benceno-
metanol (7:3), el valor Rf para la monensina es de 0,62 mien-
tras que el valor Rf para el metabolito A-27106 es de 0,49.
Para la detección puede utilizarse un reactivo de vainillina
20 pulverizado. Este reactivo se prepara agregando 2 ml de áci-
do sulfúrico fumante sobre una solución de 3 g de vainillina
en 100 ml de etanol absoluto.

25 El metabolito A-27106 se encuentra tanto en el cal-
do de cultivo como en los micelios. Por consiguiente, las téc-
nicas empleadas en el aislamiento del metabolito A-27106 es-
tán proyectadas para permitir la máxima recuperación del pro-
ducto de una cualquiera de las fuentes o de ambas. Así, por
ejemplo, se filtra el medio de fermentación y tanto el filtra-
do como la torta micelial se extraen con disolventes adecua-
dos para obtener el metabolito A-27106. El producto se recu-
30

422834

- 15 -

26



1 pera de los disolventes de extracción por métodos habituales
comúnmente empleados en la técnica.

5 Alternativamente, los sólidos del cultivo, incluidos
los constituyentes medios y el micelio, pueden ser utiliza-
dos sin extracción o separación, pero preferiblemente con eli-
minación del agua del micelio y del medio de cultivo, como
fuente del metabolito A-27106. Por ejemplo, el medio de cul-
tivo puede ser secado por liofilización y mezclado en la ali-
mentación. Asimismo, los sólidos pueden ser convertidos sin
10 separación total del agua en una suspensión delgada que es
adecuada para la adición a la pastura húmeda y a piensos
similares.

15 No es obligatorio ningún proceso único de extrac-
ción/aislamiento. En un método satisfactorio, el medio de
cultivo acabado se filtra, utilizando un auxiliar de filtra-
ción. La torta del filtro se extrae con un disolvente polar
como el metanol. El extracto metanólico se concentra y des-
pués se agrega al filtrado acuoso original. Esta solución
combinada se extrae dos veces con medios volúmenes de cloro-
20 formo. Los extractos clorofórmicos se evaporan a vacío para
dar un aceite ambarino oscuro.

25 Este aceite se decolora sobre una columna de car-
bón activo, empleando cloroformo y alrededor de 20 g de car-
bón activo por gramo de aceite. El eluato se concentra de
nuevo a vacío para dar un aceite entre amarillo pálido e in-
coloro. Este aceite, disuelto en una cantidad mínima de clo-
roformo, es cromatografiado sobre una columna de gel de síli-
ce, empleando acetato de etilo como disolvente. La elución
se vigila por cromatografía en capa fina. Las impurezas se
30 eluyen con acetato de etilo. Por elución con mezclas de ace-

422834

- 16 -

26



1 tato de etilo y metanol se obtiene el metabolito A-27106.

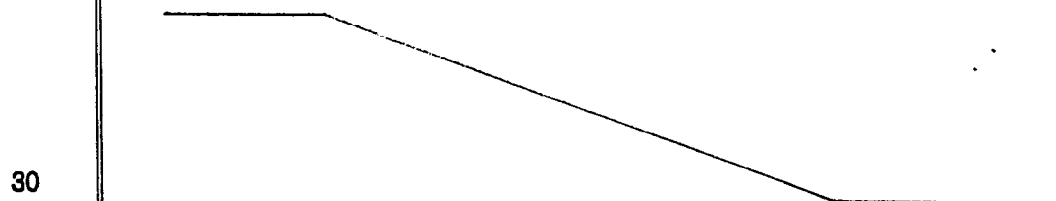
5 El metabolito A-27106 (sal sódica) es un sólido cristalino blanco, que funde con formación de burbujas alrededor de 170-175°C. El metabolito A-27106 forma al parecer un hidrato u otro solvato muy fácilmente. Cuando el A-27106 está hidratado o solvatado, su punto de fusión varía, fundiendo generalmente algunos grados por debajo del valor indicado.

10 El análisis elemental del metabolito A-27106 dió la siguiente composición en porcentaje: carbono, 58,78; hidrógeno, 8,51; oxígeno, 27,85; y sodio, 3,63. Estos valores están de acuerdo con la fórmula empírica $C_{42}H_{71}O_{16}Na$, cuya composición teórica en porcentaje es: carbono, 59,00; hidrógeno, 8,37; oxígeno, 29,94; y sodio, 2,42.

15 El metabolito A-27106 prácticamente no presenta absorción en ultravioleta por encima de unos 235 μ .

20 El espectro de absorción infrarrojo del metabolito A-27106 en cloroformo está mostrado en la Figura 1 del dibujo que acompaña a esta memoria. Los máximos de absorción distinguibles del espectro son los siguientes: 3,1, 3,36, 6,39, 6,82, 7,1, 7,25, 7,9 (hombro), 8,1, 8,3, 8,67, 8,8 (hombro), 9,04, 9,22, 9,51, 9,66, 10,03, 10,26, 10,66, 11,23, 11,47, 11,83 y 12,15.

25 El espectro de masas del metabolito A-27106 presenta un pico de ión molecular y otros picos característicos como se indica a continuación:





422834

1

m/e		
Calculado	Observado	Fragmento
854,46230	854,44530	$C_{42}H_{71}O_{16}Na$ (M^+)
836,45229	836,44129	$C_{42}H_{69}O_{15}Na$ ($M^+ - H_2O$)
779,45490	779,44690	$C_{40}H_{68}O_{13}Na$ ($M^+ - [CH_3O + CO_2]$)
761,44540	761,44740	$C_{40}H_{66}O_{12}Na$ ($M^+ - [CH_3O + CO_2 + H_2O]$)

5

10

Estos hallazgos confirman la fórmula empírica atribuída y un peso molecular de 854 para la sal sódica del metabolito A-27106.

15

En general, el metabolito A-27106 es fácilmente soluble en los disolventes muy polares, es insoluble en los disolventes polares y su solubilidad varía en los disolventes de polaridad intermedia. Ilustrativamente, el A-27106 es soluble en los alcoholes alifáticos inferiores, es parcialmente soluble en fenol, éter dietílico y acetona y es relativamente insoluble en los alcanos inferiores líquidos.

20

La valoración electrométrica del metabolito A-27106 en la forma ácida en agua, a un pH inicial de 8, revela la presencia de un grupo valorable con un valor del pKa de 7,2.

25

La forma monosódica antes descrita es, en general, la forma natural del metabolito A-27106. A partir de la sal sódica se produce fácilmente el ácido; a partir del ácido, se preparan las sales de amonio y de otros metales alcalinos. Las diversas formas metálicas se comportan de manera algo similar a los carboxilatos de sales alcalinas y un poco como

30

422834



1 quelatos.

En la preparación de otra forma, el metabolito A-27106 (la forma sódica) se disuelve en un disolvente acuoso, como metanol-agua; se añade un ácido como, por ejemplo, ácido clorhídrico para reducir el pH a 5 o menos. Se separa el metanol a vacío y el producto ácido acuoso resultante se extrae con cloroformo. El extracto clorofórmico se seca y evapora para dar la forma ácida libre.

Esta forma ácida del metabolito A-27106 puede ser utilizada o puede ser modificada de nuevo valorándola con una solución acuosa de un hidróxido de metal alcalino o con amoníaco acuoso, para obtener las correspondientes formas salinas de litio, potasio, rubidio, cesio o amonio. El ácido y las formas salinas de amonio y metales alcalinos del metabolito A-27106 son todas ellas biológicamente activas.

La estructura exacta del metabolito A-27106 no es conocida. Se sabe que en la conversión de la monensina en metabolito A-27106 es necesaria la glucosa, que es consumida, incluso en ausencia de las células metabolizantes de S. candidus. El peso molecular del A-27106 corresponde al de una glucosil-monensina.

Además de los grupos hidroxilo terciarios altamente impedidos sobre el anillo E, habría cinco centros hidroxílicos sobre una glucosil-monensina y algunos de los cuales o todos ellos serían susceptibles de reacción para formar un éster sencillo como el acetato. La presencia de estos cinco centros reactivos ha sido demostrada mediante experimentos de esterificación.

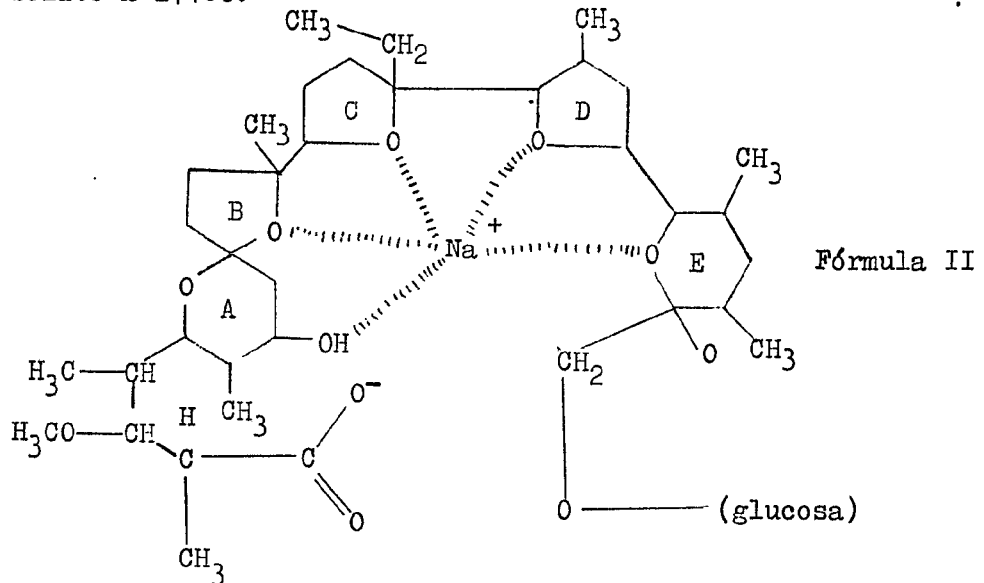
Basándose en las características físicas antes citadas, puede proponerse la siguiente estructura para el meta-

422834

- 19 -



1 bolito A-27106:



15 Como la estructura es solamente postulada, se sobreentiende que la estructura presentada en lo que antecede representa solamente una hipótesis de trabajo.

El metabolito A-27106 es menos tóxico que la monensina. En las pruebas en las que el metabolito A-27106 se ha administrado intraperitonealmente a grupos de 6 ratones cada uno:

20 a 50 mg/kg, murió uno de cada seis ratones;

a 100 mg/kg, murieron tres de cada seis ratones.

En pruebas similares, cuando se administró monensina intraperitonealmente a grupos de seis ratones cada uno:

25 a 10 mg/kg, murió uno de cada seis ratones;

a 20 mg/kg, murieron tres de cada seis ratones.

30 Para la prevención o el tratamiento de la coccidiosis en el ganado aviar, se administra a las aves una cantidad coccidiostática y no tóxica del metabolito A-27106, preferiblemente por vía oral, sobre una base diaria. Aunque deben tenerse en consideración diversos factores al determinar la



422834

1 concentración apropiada de A-27106, la proporción de adminis-
tración estará comprendida generalmente entre 0,005 y 0,05 %
en peso del pienso no medicado y preferiblemente entre 0,01
y 0,04 %. El metabolito A-27106 puede ser suministrado de mu-
5 chas formas pero lo más cómodo es suministrarlo con un vehí-
culo fisiológicamente aceptable, preferiblemente el pienso
ingerido por las aves.

El metabolito A-27106 también mejora la utiliza-
ción del pienso por los rumiantes que poseen una función de-
10 sarrollada del rumen. Los rumiantes jóvenes, fundamentalmen-
te los que no han sido destetados, funcionan como animales
monogástricos. A medida que los rumiantes jóvenes comienzan
a ingerir pienso sólido, comienza a desarrollarse la función
del rumen y la población microbiológica del rumen comienza a
15 aumentar. Después de que el animal ha comido pienso sólido
durante algún tiempo, la función de su rumen alcanza un desa-
rrollo total y continúa actuando durante toda la vida del ani-
mal. Algunos animales rumiantes económicamente importantes
son el ganado vacuno, las ovejas y las cabras.

20 El metabolito A-27106 es típicamente eficaz en el
aumento de la eficiencia de la utilización del pienso cuando
se administra por vía oral a los rumiantes, en proporciones
que varían aproximadamente entre 0,05 mg/kg/día y 2,5 mg/kg/
25 día. Los resultados más beneficiosos se consiguen en propor-
ciones del orden de 0,1 mg/kg/día a 1,5 mg/kg/día. Un método
preferido de administración del metabolito A-27106 consiste
en mezclarlo con el pienso del animal; sin embargo, puede
ser administrado por otros métodos, por ejemplo mediante
30 tabletas, purgas, bolos o cápsulas. La formulación de estas
diversas formas de dosificación puede realizarse por métodos

422834

- 21 -



1 muy conocidos en farmacia veterinaria. Cada dosis unitaria individual debe contener una cantidad de metabolito A-27106 directamente relacionada con la dosis diaria apropiada para el animal en tratamiento.

5 A continuación incluimos varios ejemplos.

EJEMPLO 1

Preparación de A-27106 a partir de monensina por S.candidus

10 Se cultiva S.candidus NRRL 5449 en un tubo inclinado de ágar preparado a partir de medio de Bennett para formar una colonia bien definida. Se retira la colonia y se forma con ella una suspensión empleando 10 ml de agua desionizada estéril.

15 Esta suspensión se divide entre 4 matraces sacudidos de 500 ml, conteniendo cada uno de ellos 100 ml de medio vegetativo de la siguiente composición:

<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad</u>
Solubles de destilería de maíz [*]	25,0 g
Lactosa	10,0 g
Maltosa	10,0 g
20 FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,0 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
CaCO ₃	2,0 g
Agua desionizada c.s. hasta	1,1 litros

25 ^{*} Nadrisol, National Distillers Products Company, U.S.A.

30 Los cuatro matraces inoculados son incubados a 30°C en un sacudidor rotatorio a 250 rpm, durante 24 horas. Este medio vegetativo (porciones de 10 ml) se utiliza para inocular cada uno de los 15 matraces sacudidos (500 ml) que

422834

- 22 -



1 contienen 100 ml de un medio de fermentación esterilizado de la siguiente composición:

	<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad</u>
	Extracto de buey	5 g.
5	Hidrolizado pancreático de caseína-peptona	5 g
	NaCl	5 g
	Glicerol	15 g
	CaCO ₃	2 g
10	Agua desionizada c.s. hasta	1 litro

El medio tiene un pH de 7,2 que no es ajustado. El medio inoculado se incubó durante 72 horas como se ha descrito anteriormente.

15 En un fermentador de 40 litros se prepara un medio de producción de la siguiente composición:

	<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad</u>
	Aceite de polisiloxano como agente antiespumante	5 g
	Glicerol	375 g
	Dextrosa	625 g
20	Hidrolizado pancreático de caseína-peptona	125 g
	Extracto de buey	125 g
	NaCl	125 g
	CaCO ₃	50 g
25	Agua desionizada c.s. hasta	24 litros

El pH inicial del medio es 7,0. Después el medio se esteriliza tratándolo en autoclave a 120°C durante 30 minutos y una presión de 15-20 psi (1-1,4 kg/cm²). Después de la esterilización, el pH del medio es 7,6.

30 Se añaden 25 g de monensina purificada disueltos



422834

1 en 200 ml de etanol sobre el medio esterilizado y se introducen 700 ml del inoculum vegetativo de segunda etapa, preparado como se ha descrito en lo que antecede.

5 El medio de fermentación se airea con aire estéril a un caudal de 0,35 pies³ (alrededor de 1 litro) por minuto y se agita con agitadores convencionales a 420 rpm. El medio inoculado se incuba a 30°C durante 114,5 horas aproximadamente.

10 El curso de la fermentación se sigue por cromatografía en capa fina sobre gel de sílice como se ha descrito antes. Al principio de la fermentación solamente hay presente monensina. Gradualmente una segunda mancha indica la presencia del metabolito A-27106 y finalmente solo se encuentra la mancha del metabolito A-27106.

15 EJEMPLO 2

Aislamiento y purificación de A-27106

20 Se filtra el caldo de fermentación, preparado en la forma descrita en el Ejemplo 1, empleando un auxiliar de filtración. La torta micelial se extrae con metanol (alrededor de 5 litros) a la temperatura ambiente. Se filtra el extracto metanólico; el filtrado se concentra a vacío, separándose el metanol y quedando un concentrado acuoso.

25 Este concentrado acuoso se combina con el filtrado del caldo original. La solución combinada (alrededor de 22 litros) se extrae dos veces con medios volúmenes de cloroformo. Los extractos clorofórmicos se combinan y concentran a vacío hasta unos 400 ml de un aceite ambarino oscuro.

30 Este aceite, disuelto en cloroformo, se decolora sobre una columna de 10 kg de carbono (Pittsburg 12" x 40", 30 x 100 cm), eluyendo con cloroformo (alrededor de 5 litros).

422834



1 El eluato clorofórmico se evapora a vacío para dar alrededor de 500 ml de un aceite entre incoloro y amarillo pálido.

5 El aceite decolorado, en una cantidad mínima de cloroformo, se cromatografía después sobre una columna de 25 kg de gel de sílice (Grace, grado 62) en acetato de etilo. La elución se sigue por cromatografía en capa fina como se ha descrito antes. Después de separar las impurezas con acetato de etilo, el metabolito A-27106 se eluye de la columna con una mezcla de acetato de etilo y metanol 19:1. Las fracciones que contienen A-27106 se combinan y evaporan a sequedad bajo vacío para dar un producto amorfo casi blanco. El producto se lava con hexano y se seca para dar alrededor de 12,84 g de metabolito A-27106 (material de una sola mancha por cromatografía en capa fina).

15

EJEMPLO 3

Producción de A-27106 por S. cinnamomensis y S. candidus

Otro método de producción del metabolito A-27106 por cultivo en fermentador es ilustrado por el siguiente procedimiento:

20

Se desarrolla convencionalmente el Streptomyces cinnamomensis ATCC 15413 (véase la patente estadounidense 3.501.568) en 55 ml de medio, en un matraz sacudido de 250 ml, incubando durante 47 horas para obtener un inoculum vegetativo. Este inoculum vegetativo se agrega sobre 220 ml de medio en un matraz sacudido de 1 litro y se incuba durante 21 horas para obtener un inoculum para la siembra del fermentador.

25

El inoculum así preparado se utiliza para sembrar un fermentador de 40 litros, que contiene un medio térmicamente esterilizado de la siguiente composición:

30

422834

- 25 -



	<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad</u>
1	Glucosa	750,0 g
	Harina de soja	625,0 g
	Aceite de soja	500,0 g
5	Oleato de metilo	500,0 g
	Aceite de polisiloxano como anti-espumante	5,0 g
	Cloruro potásico	2,5 g
	Fosfato dipotásico hidrógeno	2,5 g
10	Tetrahidrato de cloruro manganoso	15,0 g
	Sulfato férrico hidratado	7,5 g
	Carbonato cálcico	25,0 g
	Agua desionizada c.s. hasta	24 litros

El medio resultante tiene un pH de 5,5 que se ajusta a 8,0 por adición de 15 ml de hidróxido potásico 10N. El medio inoculado se incuba a 32°C durante 234 horas.

Al cabo de 42 horas, se aumenta la aireación desde 0,35 a 0,8 pies³ por minuto (9,9 a 22,6 litros/minuto) y la agitación se aumenta desde 500 a 700 rpm. La producción de monensina es prácticamente completa al cabo de 210 horas, como se determina mediante un bioensayo en capa fina con Bacillus subtilis ATCC 6633 como organismo detector.

Al cabo de 234 horas, el contenido del fermentador es pasterizado para inactivar al S. cinnamomensis. Entonces se agregan los siguientes nutrientes al fermentador:

	<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad</u>
	Dextrosa	750 g
	Harina de soja	625 g
	Tetrahidrato de cloruro manganoso	155 g
30	Carbonato cálcico	12,5 g

422834



	<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad</u>
1	Hexahidrato de sulfato férrico	7,5 g
	Cloruro potásico	2,5 g
	Fosfato dipotásico hidrógeno	2,5 g
5	Oleato de metilo	250 ml
	Aceite de soja	250 ml
	Agua desionizada c.s.	24 litros

El pH se ajusta a 8,0 con 215 ml de NaOH 5N y se esteriliza el medio. Después el medio se inocula con un cultivo vegetativo de crecimiento rápido de Streptomyces candidus NRRL 5449 y se incuba durante 137 horas a 30°C. La fermentación es aireada con aire estéril a un caudal de 0,35 pies³/minuto (9,9 litros/minuto). El medio de fermentación se agita con agitadores convencionales primero a 120 rpm, aumentando al cabo de 16 horas hasta 420 rpm y al cabo de 40 horas hasta 500 rpm. Se añaden 400 g de dextrosa a cada uno de los tiempos 44, 66,5, 89, 97, 113 y 127 horas. Al cabo de 72 y 99 horas se agregan 175 g cada vez de carbonato cálcico.

Para vigilar la fermentación se utiliza cromatografía en capa fina como se ha descrito anteriormente. Al cabo de 137 horas, la producción del metabolito A-27106 es prácticamente completa. Para el tratamiento y purificación del A-27106 se siguen los procedimientos descritos en el Ejemplo 2.

EJEMPLO 4

Producción de A-27106 mediante un enzima de *S. candidus* en partículas

Preparación

Se cultiva *S. candidus* NRRL 5449 en la forma des-



1 crita en el Ejemplo 1, a escala de 100 litros. Se separan
las células del medio de fermentación por filtración a vacío
y se dividen en partes alícuotas de 200 g que se almacenan
por congelación. Dos de estas partes alícuotas se desconge-
5 lan a la temperatura ambiente y se suspenden en una solu-
ción reguladora de fosfato 0,05M (pH 5,8) hasta un volumen
final de 600 ml. Esta suspensión celular es sonificada duran-
te 30 minutos y el producto sonificado se centrifuga a
10.000 rpm durante 30 minutos. Los residuos celulares resul-
10 tantes se suspenden en 100 ml de la solución reguladora an-
tes mencionada; esta suspensión se dializa durante 18 horas
con 5 litros de la solución reguladora enfriada antes men-
cionada. A 50 ml del dializado en partículas se añaden 120
mg de D-glucosa y 25 mg de monensina en 2 ml de etanol. La
15 mezcla de reacción se agita durante 72 horas a 30°C y des-
pués se filtra; el filtrado se extrae con 100 ml de clorofo-
rmo. Este extracto clorofórmico, concentrado a vacío, se cro-
matografía sobre una columna de gel de sílice (10 g). Por
dilución con acetato de etilo se obtienen solamente trazas
20 de monensina. Por elución con una mezcla 19:1 de acetato de
etilo y metanol se obtienen 17 mg del metabolito A-27106,
idéntico al obtenido en el Ejemplo 2.

EJEMPLO 5

Control de la coccidiosis con el metabolito A-27106

25 Se utiliza un grupo de 75 pollitos, de raza cruza-
da, de una semana de edad, sanos, criados en incubadora y
batería, de un tipo asadero pesado. Los pollos se dividen
en 5 grupos de 15 unidades cada uno, con tres duplicados de
subgrupos de 5 pollos cada uno. Cada subgrupo se cría fuera
30 del contacto con los otros subgrupos. Un primer grupo se man-

422834

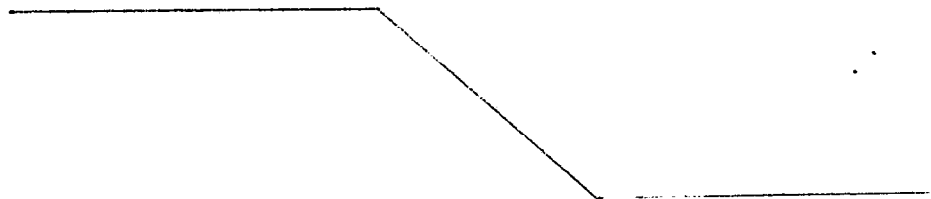


1 tiene como control sano no tratado, en condiciones favorables.
Un segundo grupo se trata como el primero, pero es inoculado
con coccidiosis por administración oral de una dosis que con-
tiene 10^5 oocistos esporulados de Eimeria tenella. El tercero,
5 cuarto y quinto grupos se tratan como el segundo grupo a ex-
cepción de que, 24 horas antes de la citada inoculación, su
alimentación se modifica por adición de metabolito A-27106
a concentraciones de 100, 150 y 200 partes por millón (ppm)
respectivamente.

10 Siete días después de la inoculación, los pollos
se pesan, se sacrifican y se examinan los indicios de lesio-
nes coccidiales. La enfermedad coccidial se expresa mediante
una escala arbitraria de 0 a 4. En el título "clasificación de
la lesión" se indica el número de pollos a cada nivel. Cero
15 es indicativo de ausencia total de coccidiosis. Uno designa
la mínima enfermedad coccidial que puede observarse. Dos in-
dica una enfermedad moderada con poca o ninguna hemorragia y
ningún daño grave a los tejidos. Tres indica hemorragia, in-
flamación del intestino ciego y extenso ataque a los tejidos.
20 Cuatro indica hemorragia, un núcleo de sangre coagulada en el
intestino ciego y células epiteliales destrozadas. Los pollos
con una clasificación de cuatro o menos habitualmente se re-
cuperan si no son infectados de nuevo con coccidios.

25 Utilizando los procedimientos descritos, se obser-
varon los siguientes resultados:

30





422834

1

Grupo de pollos	Inoculados con <i>E. tenella</i>	Metabolito A-27106 (ppm) en la dieta	Aumento medio de peso/pollo en gramos	Clasificación de las lesiones				
				0	1	2	3	4
1	no	0	162	15	0	0	0	0
2	sí	0	67	0	0	0	0	15
3	sí	100	157	4	1	0	3	7
4	sí	150	150	3	3	1	1	7
5	sí	200	166	5	0	0	0	10

5

10

En los pollos medicados con alta puntuación de las lesiones, la sangre fecal era escasa o ausente y los pollos parecían encontrarse en buen estado. Su buen aumento de peso fué considerado como más significativo que la puntuación de las lesiones.

15

Como los estudios indican que el metabolito A-27106 habitualmente mata al *E. tenella* cuando éste intenta establecerse por primera vez en la célula huésped, es preferible un régimen profiláctico de tratamiento.

20

En otros estudios, se ha encontrado que el metabolito A-27106 es de sabor más agradable para los pollos y también es menos tóxico que la monensina.

25

Se realizaron otros numerosos estudios con el metabolito A-27106, tanto solo como en combinación con monensina. Estos estudios demostraron que aunque el A-27106 no produce mayores aumentos de peso a 0,04 % que a 0,01 %, la proporción mayor da lugar a un número menor de lesiones del intestino ciego. No se observó ninguna evidencia de toxicidad a la proporción más alta.

30

Dentro de la gama general de eficacia, la monensina y el metabolito A-27106 combinados en la dieta presentan

422834



1 como mínimo un resultado aditivo en su eficacia pero no en su toxicidad. La toxicidad de la combinación es menor que la de la monensina sola a una proporción igual a la de los productos combinados.

5

EJEMPLO 6

Ración para pollos modificada con A-27106 para el control de la coccidiosis

10 Se prepara una ración equilibrada, muy energética, adecuada para alimentar pollos con un rápido aumento de peso, mediante la siguiente receta:

	<u>Ingredientes</u>	<u>%</u>	<u>kg</u>
	Maíz amarillo molido	50	1000
	Harina de soja, descascarillada, extraída con disolvente, finamente molido, 50 % de proteínas	31,08	621,6
15	Grasa animal (sebo de buey)	6,5	130
	Carne de pescado desecada, con solubles (60 % de proteínas)	5,0	100
	Solubles de destilería del maíz	4,0	80
	Fosfato dicálcico, calidad alimentaria	1,8	36
20	Carbonato cálcico	0,8	16
	Premezcla vitamínica (representando vitaminas A, D, E, K y B ₁₂ , colina, niacina, ácido pantoténico, riboflavina, biotina, con glucosa como agente de relleno)	0,5	10
	Premezcla de minerales trazas (representando MnSO ₄ , ZnO, KI, FeSO ₄ , CaCO ₃)	0,2	4
25	Acido 2-amino-4-hidroxibutírico (hidroxianálogo de la metionina)	0,1	2
	Metabolito A-27106	0,02	0,4

30 Estas sustancias se mezclan de acuerdo con técnicas corrientes de mezclado de piensos. Los pollos alimentados con esta ración, con agua a voluntad, quedan protegidos de la exposición a la coccidiosis; los aumentos de peso son compara-



422834

1 bles a los de los pollos exentos de coccidiosis alimentados con una dieta similar pero no medicada.

EJEMPLO 7

Mayor eficiencia de utilización de los piensos mediante el

5 A-27106

Se obtiene el líquido del rumen de una ternera con una fístula instalada quirúrgicamente que se abre en dicho rumen. La ternera se mantiene en una ración muy rica en grano, cuya composición es la siguiente:

- 10 69,95 % de maíz molido grosero
- 10 % de tusas de maíz molidas
- 8 % de harina de soja (50 % de proteínas)
- 5 % de harina de alfalfa
- 5 % de melaza
- 15 0,6 % de urea
- 0,5 % de fosfato dicálcico
- 0,5 % de carbonato cálcico
- 0,3 % de sal
- 0,07 % de una mezcla previa de vitamina A y D₂*
- 20 0,05 % de una mezcla previa de vitamina E**
- 0,03 % de una mezcla previa de minerales trazas***

25 * Conteniendo por cada 454 g: 2.000.000 de U.I. de vitamina A; 227.200 U.I. de vitamina D₂ y 385,7 g de pienso de soja con un 1 % de aceite añadido

** Granos secos de destilería de maíz con solubles conteniendo 20.000 U.I. de acetato de d- α -tocoferilo por cada 454 g

30 *** Conteniendo óxido manganeso, yoduro potásico, carbonato de cobalto, óxido de cobre y sulfato de cinc.

422834



1 Una muestra del líquido del rumen se cuele a través
de cuatro capas de tela de cedazo y se recoge el filtrado. La
materia en partículas retenida por el cedazo se suspende de
nuevo en solución reguladora fisiológica suficiente para de-
5 volverla al volumen original del líquido de rumen y esta sus-
pensión se cuele de nuevo. La solución reguladora utilizada
tiene la siguiente composición:

	<u>g/litro</u>	<u>Ingrediente</u>
	0,316	Na_2HPO_4
10	0,152	KH_2PO_4
	2,260	NaHCO_3
	0,375	KCl
	0,375	NaCl
	0,112	MgSO_4
15	0,038	CaCl_2
	0,008	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	0,004	MnSO_4
	0,004	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	0,002	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
20	0,001	CaCl_2

como describen Cheng y colaboradores en J. Dairy Sci. **38**,
1225 (1955).

25 Se combinan los dos filtrados y se dejan en reposo
hasta que la materia en partículas se separa en la parte su-
perior. Se separa la capa transparente, se diluye con el mis-
mo regulador (1:1) y después se ajusta a pH 7,0.

30 En un matraz de 25 ml se introducen 10 ml del líqui-
do del rumen diluido con 40 mg del pienso antes descrito,
5 mg adicionales de proteína de soja y el compuesto que ha de
ser ensayado. Para cada tratamiento se utilizan cuatro matra-

422834



1 ces repetidos. También se emplean dos juegos de cuatro matra-
 ces de control. Se utiliza un control de tiempo cero y un con-
 5 trol incubado de 16 horas. Todos los matraces experimentales
 se incuban durante 16 horas a 38°C. Después de la incubación
 se mide el pH y se agrega a cada matraz 2 ml de ácido meta-
 fosfórico al 25 %. Las muestras se dejan sedimentar y el lí-
 quido que sobrenada se analiza por cromatografía de gases pa-
 ra determinar los compuestos propionato, acetato y butirato.
 Los compuestos activos aumentan considerablemente la produc-
 10 ción de propionato con respecto a los controles.

Los resultados con los compuestos de ensayo son estadísticamente comparados con los resultados del control. La tabla dada a continuación muestra la relación de concentraciones de ácidos grasos volátiles en los matraces trata-
 15 dos con metabolito A-27106 y las concentraciones en los ma-
 traces de control.

mcg de A-27106/ml de líquido de rumen diluido	Propionato	Butirato	AGV totales
5	2,15	0,73	1,93
1	1,42	0,96	0,98
0,2	1,02	0,91	1,07

EJEMPLO 8

Ración para ganado vacuno mejorada con A-27106

25 Se prepara una ración equilibrada rica en grano pa-
 ra ganado vacuno como sigue:

<u>Ingrediente</u>	<u>Porcentaje</u>	<u>Kg/Tm</u>
Maíz finamente molido	67,8	1356
Tusas de maíz molidas	10	200
Harina de alfalfa deshidratada, 30 17 % de proteína	5	100



422834

1	<u>Ingredientes</u>	<u>Porcentaje</u>	<u>Kg/Tm</u>
	Harina de soja descascarilla da, extraída con disolventes, 50 % de proteínas	9,956	199,12
	Melazas de caña de azúcar	5	100
5	Urea	0,6	12
	Metabolito A-27106	0,044	0,88
	Fosfato dicálcico, calidad alimentaria	0,5	10
	Carbonato cálcico	0,5	10
10	Cloruro sódico	0,3	6
	Premezcla de minerales traza	0,03	0,6
	Premezcla de vitamina A, dna, D ₂ *	0,07	1,4
	Premezcla de vitamina E**	0,05	1,0
15	Propionato cálcico	0,15	3,0
	* Conteniendo por cada 454 g: 2.000.000 de U.I. de vitamina A; 227.200 U.I. de vitamina D ₂ y 385,7 g de pienso de soja con un 1 % de aceite añadido		
20	** Granos secos de destilería de maíz con solubles conteniendo 20.000 U.I. de acetato de d- α -tocoferilo por cada 454 g.		
25	El pienso mezclado se comprime en gránulos. A un ritmo de ingestión diaria medio de 15 libras (6,8 kg) de pienso por el animal, este pienso suministra aproximadamente 300 mg de A-27106 por animal y por día.		
	<u>EJEMPLO 9</u>		
	<u>Forma ácida del metabolito A-27106</u>		
30	Se disuelven 100 mg del metabolito A-27106, preparado en la forma sódica por los procedimientos descritos		

422834

- 35 -

20



1 en los Ejemplos 1 y 2, en 100 ml de una mezcla 1:1 de metanol y agua. La solución resultante se valora hasta pH 3 por adición gota a gota de HCl 1N. Después se separa el metanol a vacío.

5 La solución resultante se extrae dos veces con 100 ml de cloroformo cada vez. El extracto clorofórmico se seca sobre sulfato magnésico y se evapora a vacío para dar 85 mg de la forma ácida del metabolito A-27106.

10 La forma ácida del A-27106 es un sólido amorfo blanco, con un peso molecular de 832 aproximadamente. La actividad biológica de la forma ácida es aproximadamente igual a la de la forma sódica.

EJEMPLO 10

Sal de cesio del metabolito A-27106

15 En 100 ml de una mezcla 1:1 de metanol y agua se disuelven 97,3 mg de la forma ácida del metabolito A-27106, preparado como se describe en el Ejemplo 9. La solución resultante se valora hasta pH 7,1 por adición gota a gota de hidróxido de cesio 1N. El metanol se separa a vacío. Esta solución
20 se extrae dos veces con volúmenes iguales de cloroformo. El extracto clorofórmico se seca sobre sulfato magnésico y se evapora a vacío para obtener un sólido amorfo blanco. El análisis elemental indica la presencia de alrededor del 13 % de metal.

25

EJEMPLO 11

Sal de litio del metabolito A-27106

30 Se repite el procedimiento del Ejemplo 10, empleando hidróxido de litio en lugar de hidróxido de cesio. La sal de litio del A-27106 es un sólido blanco que presenta cierta organización con tendencia a la cristalinidad, pero



422834

1 carece de un diagrama de difracción de rayos X bien organizado.

EJEMPLO 12

Sal amónica del metabolito A-27106

5 Se emplea el procedimiento del Ejemplo 10, utilizando hidróxido amónico en lugar de hidróxido de cesio, para producir la forma amónica del metabolito A-27106. Este producto presenta las propiedades y aplicaciones generales de las otras formas.

10 En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

15 1. Un procedimiento para la preparación del metabolito A-27106, o sus formas ácida, amónica, lítica, potásica, rubídica o césica, metabolito que es un sólido cristalino blanco, relativamente soluble en alcanoles inferiores, pero generalmente insoluble en alcanos inferiores y que tiene:

- 20 a) un peso molecular de 854, determinado por espectrometría de masas;
- b) una composición elemental aproximada de 58,78 % de carbono, 8,51 % de hidrógeno, 27,85 % de oxígeno y 3,63 % de sodio;
- c) una fórmula empírica de $C_{42}H_{71}O_{16}Na$;
- 25 d) un espectro de absorción infrarrojo en cloroformo como el mostrado en el dibujo que acompaña a esta memoria;
- e) un espectro de masas que presenta un pico de ión molecular a m/e 854,44630 y picos característicos a m/e 836,44129, 779,44690 y 761,44740 y
- 30 f) un valor Rf de 0,49 por cromatografía en capa fina sobre gel de sílice en benceno-metanol (7:3) y cuya forma ácida es un sólido blanco con un peso molecular de



422834

- 37-

26



1 832 aproximadamente y un grupo valorable con un valor del
pKa de 7,2; cuyo procedimiento se caracteriza por cultivar
5 Streptomyces candidus NRRL 5449 en un medio de cultivo que
contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales
inorgánicas, en condiciones aerobias sumergidas, y poner
en contacto este cultivo, completo y desde el primer momen
to, o después de separar el caldo o las células, con gluco
sa y monensina, hasta que la momensina ha sido convertida en
una cantidad sustancial del metabolito A-27106 por dicho
10 organismo en el citado medio de cultivo.

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1,
caracterizado porque el medio de cultivo comprende un medio
de cultivo estabilizado, obteniéndose el medio de cultivo
esterilizado por esterilización del medio de cultivo en el
15 que se ha preparado la monensina cultivando Streptomyces
cinnamomensis en condiciones aerobias sumergidas.

3. Un procedimiento según la reivindicación 1,
caracterizado por cultivar Streptomyces candidus NRRL 5449
20 en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de
carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, bajo condiciones
aerobias sumergidas, separar el caldo de dicho medio de
cultivo, liofilizar dicho caldo, reconstituir el caldo lio-
filizado en un medio acuoso regulador y poner en contacto
dicho caldo reconstituído con glucosa y monensina hasta que
25 se produce una cantidad sustancial del metabolito A-27106
en dicho medio regulador y recuperar el metabolito A-27106
de dicho medio regulador.

4. Un procedimiento según la Reivindicación 1,
caracterizado por cultivar Streptomyces candidus NRRL 5449
30 en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de



422834

-38 -

26



1 carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, bajo condiciones
aerobias sumergidas; separar las células de dicho medio de
cultivo; purificar dichas células por sonificación, centri-
5 fugación y diálisis; hacer reaccionar dicho dializado puri-
ficado en un medio regulador acuoso con glucosa y monensi-
na hasta que se ha producido en dicho medio regulador una
cantidad sustancial de metabolito A-27106 y recuperar el
metabolito A-27106 del mismo.

10 5. Se reivindica por último como objeto sobre
el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
" UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DEL METABOLITO A-
27106 ".

15 Todo conforme queda descrito y reivindicado en
la presente Memoria Descriptiva que consta de treinta y
ocho páginas mecanografiadas.

Madrid, 31 de Enero de 1974

BERNARDO UNGRIA
p.p.

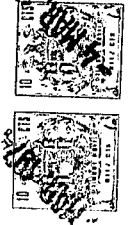
20

25

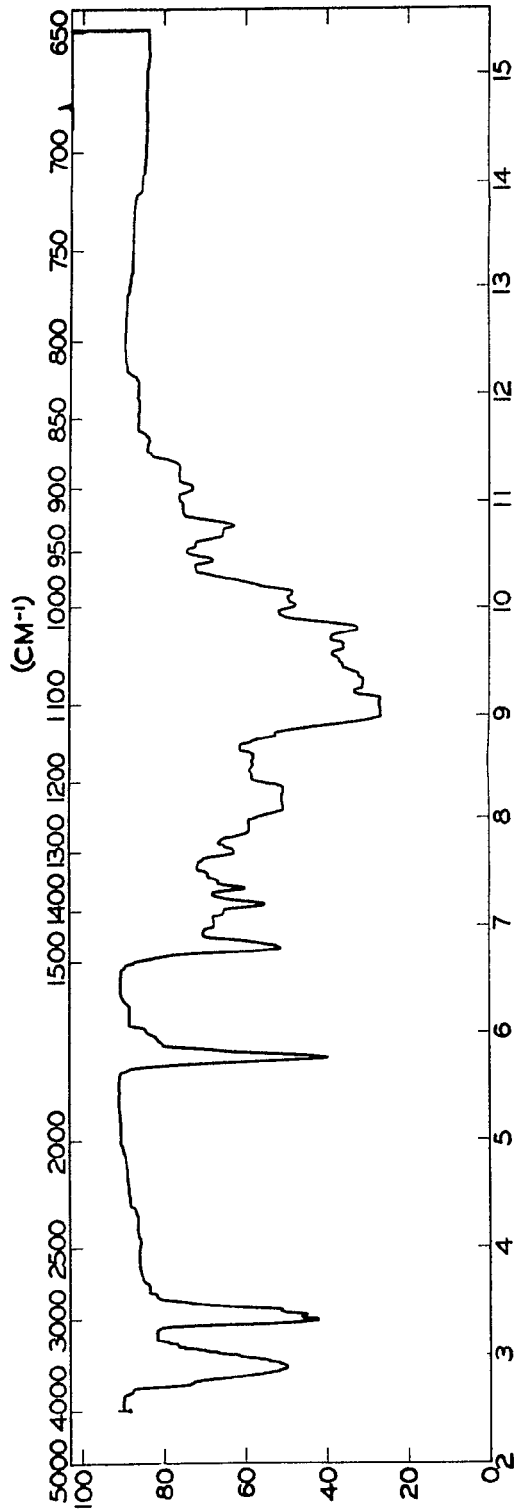
30



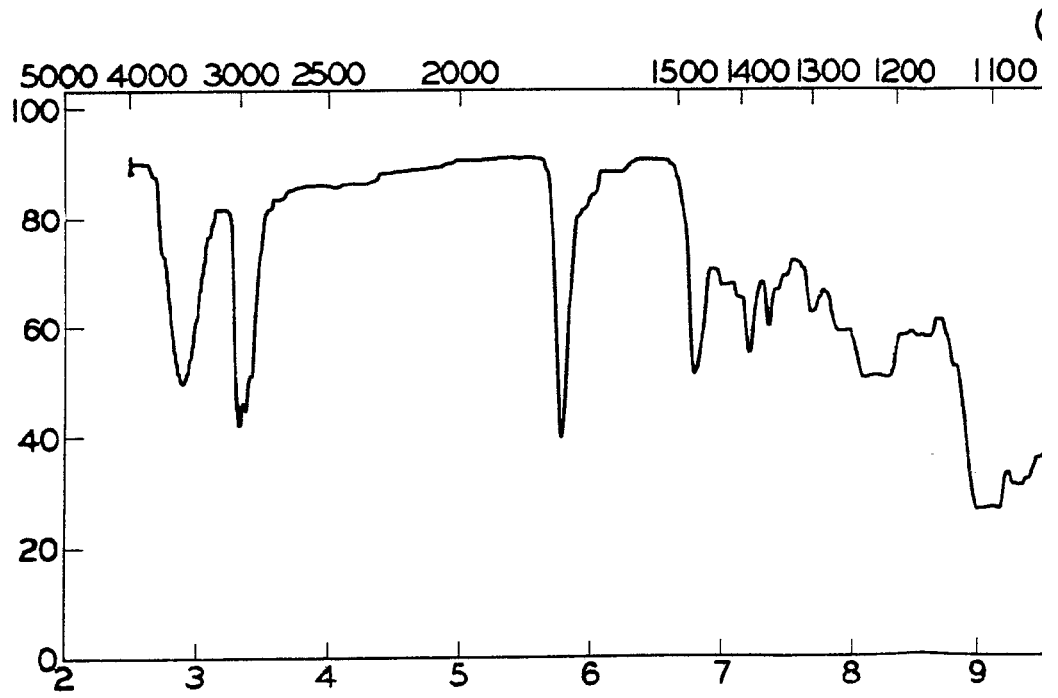
692



A-27106

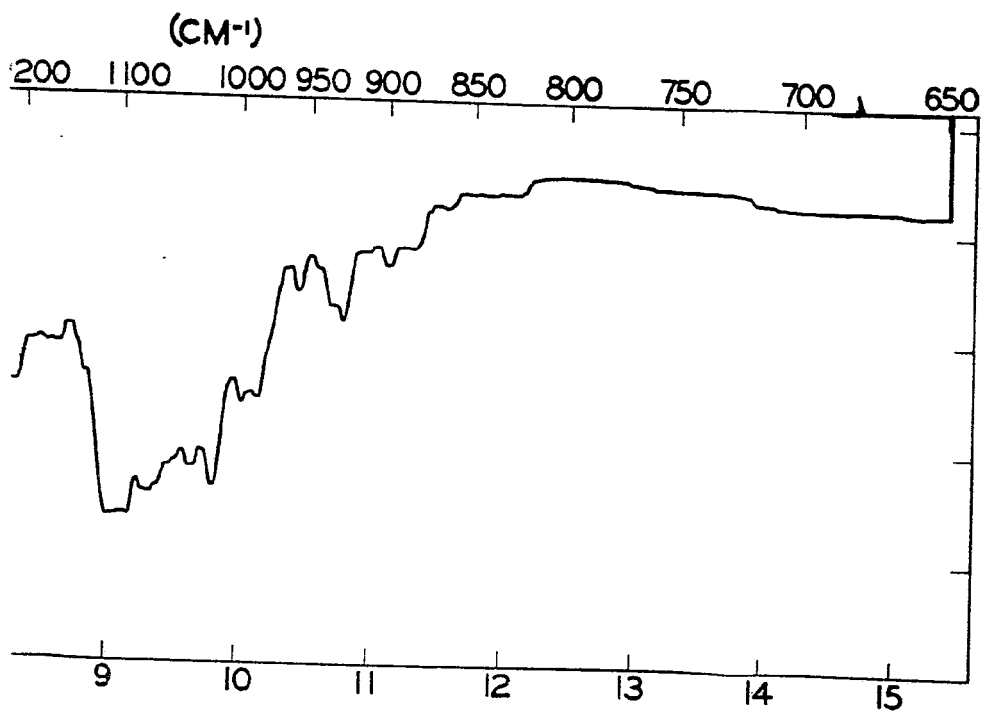


ESCALA VARIABLE
Madrid, 31 de Enero de 1.974
BERNARDO UNGRIA
p.p.





A-27106



ESCALA VARIABLE
Madrid, 31 de Enero de 1.974
BERNARDO UNGRIA
p.p.