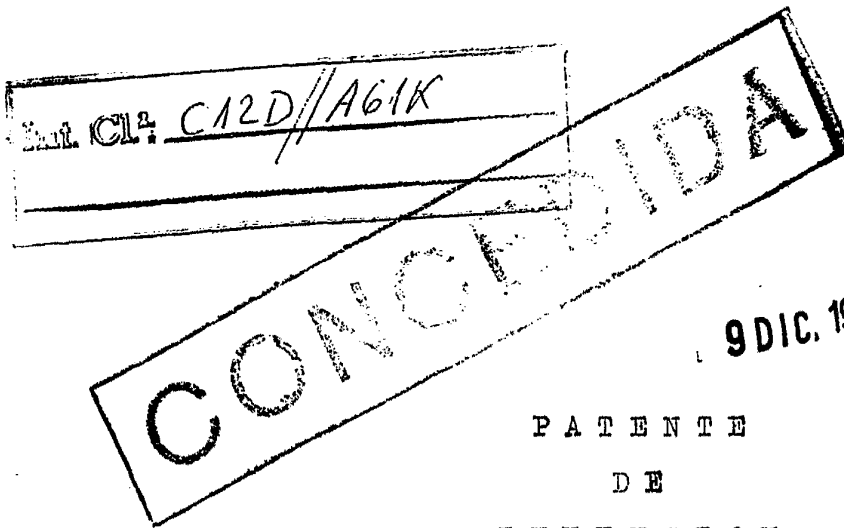


RAN 4464/25



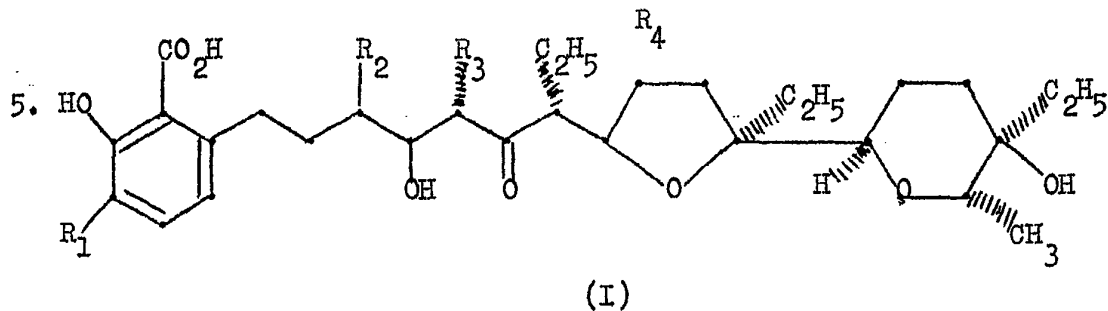
P A T E N T E
D E
I N V E N C I O N

por "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE NUEVOS ANTI-BIOTICOS HOMOLOGOS DE LA LASALOCIDA A", a favor de la firma suiza F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE., S.A., residente en BASILEA (Suiza)

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a nuevos antibióticos de la fórmula general



en la que

R_1, R_2, R_3 y R_4 se eligen del grupo constituido por

metilo y etilo, con la salvedad de que uno solo de R_1-R_4 es etilo, en forma aislada, así como a sus sales aceptables en farmacia.

5. Se ha descubierto que los antibióticos de la fórmula I y sus sales solubles de ácido aceptables en farmacia exhiben actividad coccidiostática y bactericida. Por consiguiente, pueden utilizarse como agentes coccidiostáticos y bactericidas.
10. Los nuevos antibióticos y sus sales antes citadas se preparan, de conformidad con el invento, según un procedimiento que comprende cultivar un microorganismo incluido bajo la especie de streptomyces X-537 en un medio nutriente acuoso que contiene fuentes asimilables de carbohidrato y nitrógeno bajo condiciones aeróbicas sumergidas hasta que se imparte a dicho medio actividad antibiótica sustancial, aislar los compuestos de la fórmula I así producidos de dicho medio acuoso y, si se desea, convertir un producto obtenido en una sal respectiva aceptable en farmacia.
15. El microorganismo productor de los antibióticos útiles en este invento es un organismo streptomyces aislado de una muestra de terreno recogido en Hyde Park, Massachusetts. En el departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Agricultural Research Service, Northern Utilization Research and Development Division, Peoria, Illinois se depositaron tubos liofilizados del cultivo con la designación de laboratorio X-537. El cultivo, identificado con el número NRRL 3382 por el Agricultural
- 20.
- 25.

Research Service, se ha ofrecido al público como NRRL.

A continuación se expone una descripción general de una raza típica de streptomyces X-537.

5. Cuando se ensaya el cultivo según las directrices expuestas en Stirling, E.B. y D. Gottlieb, "Methods of Characterization of Streptomyces Species", Intern. J. Systematic Bacteriol 16, 313-340, 1966 (denominado en lo sucesivo "Stirling & Gottlieb, 1966") éste produce un micelio bien desarrollado y ramificado con esporas en una
 10. cadena espiral suelta (retinaculum-apertum según la terminología de Ralf Hütter, Systematik der Streptomyceten, pág. 10, Publ. S. Karger, 1967); cada cadena comporta una media de unas 25 esporas; la superficie de la espora es rugosa.

15. La morfología de las colonias sobre diversos medios de agar es como sigue:

20.

Medio de agar 1)	Color de la superficie de las colonias 2)	Color del reverso de las colonias 3)	Pigmento soluble ⁴⁾
Levadura de malta (ISP nº 2)	2 dc (gris parduzco claro)	Oc5r (pardo amarillento)	Pardo amarillento
Avena (ISP nº 3)	e (gris metálico claro)	Co5a (amarillo blancuzco)	pardo amarillento pálido
25. Sales inorgánicas y almidón (ISP nº 4)	e	Coo4s (pardo amarillento rojizo)	pardo amarillento
Glucosa-asparagina (ISP nº 5)	2dc	Coo2m (pardo amarillento dorado)	Pardo amarillento claro

- 1) Medio según Stirling & Gottlieb, 1966
- 2) Guía de color Tresner-Backus
- 3) Guía de color Prauser's (1964)
5. 4) No se produce alteración en HCl 0,05 N o NaOH.

10. Cuando la prueba se realiza según Stirling y Gottlieb, 1966, el cultivo utiliza los siguientes carbohidratos: arabinosa 3', celulosa \pm , fructosa 3+, glucosa 3+, inositol 4+, manitol 4+, rafinosa \pm , ramnosa 2+, sucrosa +, xilosa 3+.

15. Cuando la prueba se efectúa según R.E. Gordon, "The Taxonomy of Soil Bacteria" in Ecology of Soil Bacteria, T.R.G. Gray & D. Parkinson, Eds., Liverpool University Press, Liverpool, 1967, se observan las reacciones fisiológicas siguientes :

Hidrólisis de: adenina +, caseína \pm , hipoxantina +, tirosina +, almidón de patata \pm .

Producción de: ureasa -, nitrato-reductasa-

20. Utilización de: citrato +, lactato -, malato +, mucato -, oxalato -, succinato +.

25. Acido de: adonitol -, arabinosa -, dulcitol -, eritritol -, galactosa +, glucosa +, insitol +, lactosa +, maltosa +, manitol +, manosa +, melibiosa +, alfa-metil-D-glucosido +, rafinosa -, ramnosa +, sorbitol -, trehalosa +, xilosa +.

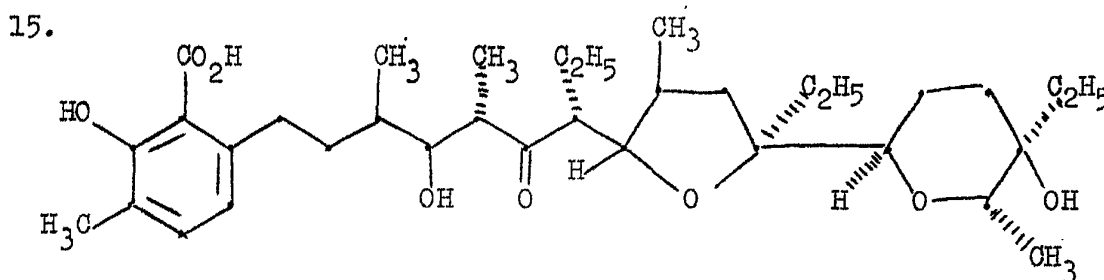
Crecimiento a: 10°C +, 42°C +, 53°C -.

Crecimiento en: caldo de lisozima -, caldo de salicilato -, caldo de glicerol +.

Utilizando los métodos del International Strep-

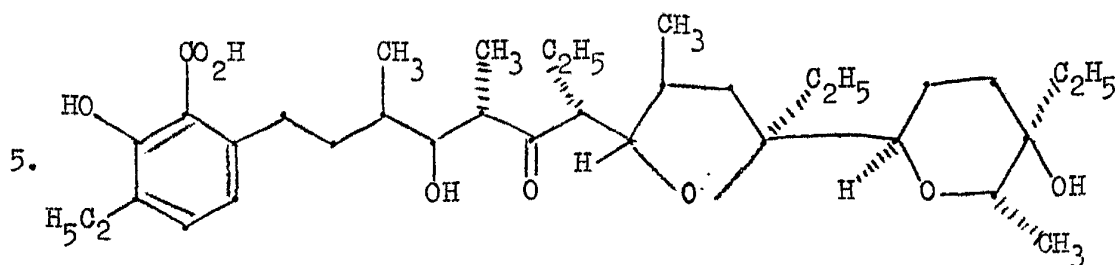
5. tomyces Project (ISP) (Stirling & Gottlieb, 1966) y la clave de Nonomura (H. Nonomura: clave para la clasificación e identificación de 458 especies de Streptomyces incluidas en ISP; J. Ferment. Technol. 52: 78-92, 1974) se aprecia que el cultivo no corresponde a ningún streptomycete examinado en estos estudios. Este contiene el L-isómero de ácido diaminopimérico.

10. El material antibiótico hasta ahora identificado como antibiótico X-537A (Lasalocida A), mediante análisis de laboratorio resulta ser el ácido 6- β -(7(R)-[5(S)-etil-5-(5(R)-etiltetrahydro-5-hidroxi-6(S)-metil-2H-piran-2(R)-il)-tetrahydro-3(S)-metil-2(S)-furyl]-4(S)-hidroxi-3(R), 5(S)-dimetil-6-oxo-nonil)-2,3-cresótico, o sea, un compuesto de la fórmula



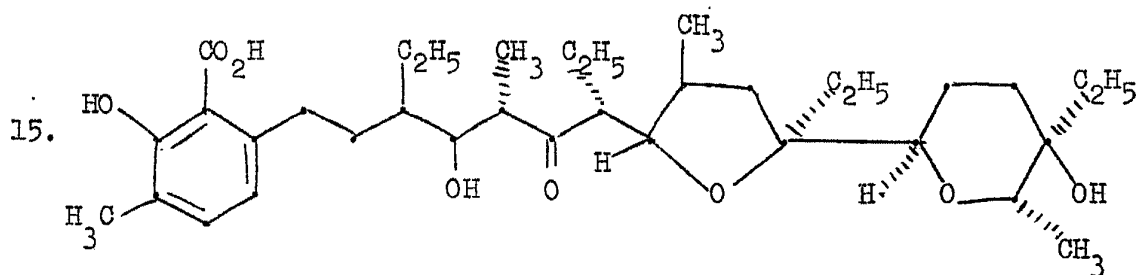
25. El presente invento se refiere a homólogos de la lasalocida A antibiótica y a sus sales aceptables en farmacia. Más concretamente, los homólogos de lasalocida del presente invento son compuestos que tienen las fórmulas y nomenclatura siguientes :

Lasalocida B:



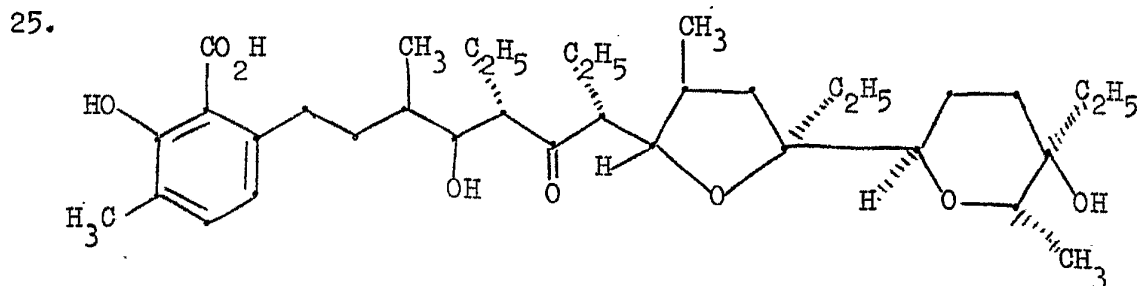
10. Acido 6- γ (R)-[5(S)-etil-5-(5(R)-etiltetrahidro-5-hidroxi-6(S)-metil-2H-piran-2(R)-il)-tetrahidro-3(S)-metil-2-(S)-fural]-4(S)-hidroxi-3(R),5(S)-dimetil-6-oxononil γ -2-hidroxi-3-etilbenzoico.

Lasalocida C :



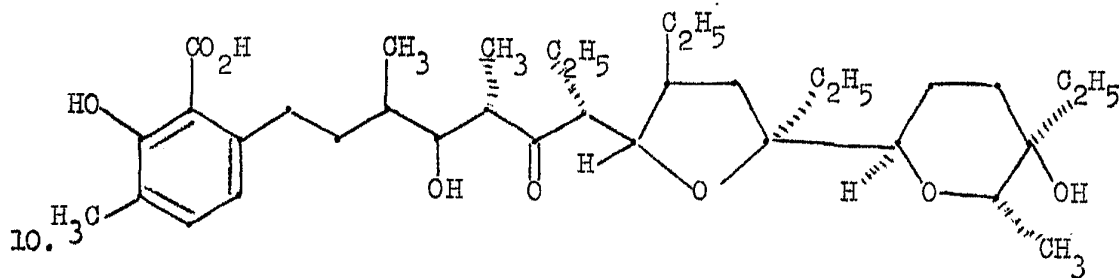
20. Acido 6- γ (R)-[5(S)-etil-5-(5(R)-etiltetrahidro-5-hidroxi-6(S)-metil-2H piran-2(R)-il)-tetrahidro-3(S)-metil-2(S)-fural]-3(R)-etil-4(S)-hidroxi-5(S)-metil-6-oxononil γ -2,3-cresótico.

Lasalocida D:



Acido 6- γ (R)-[5(S)-etil-5-(5(R)-etiltetrahidro-5-hidroxi-6(S)-metil-2H-piran-2(R)-il)-tetrahidro-3(S)-metil-2(S)-furil]-5(S)-etil-4(S)-hidroxi-3(R)-metil-6-oxononil γ 2,3-cresótico.

5. Lasalocida E:



15. Acido 6- γ (R)-[5(S)-etil-5-(5(R)-etiltetrahidro-5-hidroxi-6(S)-metil-2H-piran-2(R)-il)tetrahidro-3(S)-etil-2(S)-furil]-4(S)-hidroxi-3(R),5(S)-dimetil-6-oxono-nil γ 2,3-cresótico.

20. Los homólogos se preparan con la fermentación de streptomyces X-537 bajo condiciones sumergidas aeróbicas, con el pH del caldo de fermentación ajustado entorno del neutro, o sea, alrededor de 6,5 a 7,5. El medio utilizado contiene una fuente de nitrógeno, tal como levadura, un producto derivado de levadura, maíz, soja y similares, siendo el más preferido la glicina; sales como el fosfato potásico, carbonato cálcico y elementos vestigiales; una fuente de carbohidrato, como el azúcar, melaza y similares, prefiriéndose el azúcar moreno; y una grasa o aceite vegetal o animal tal como el aceite de soja o el aceite de manteca de cerdo para proporcionar una fuente de carbono y control de espuma y para mejorar el rendimiento de los productos finales.

25.

La fermentación se lleva a cabo a temperaturas ligeramente elevadas, por ejemplo entre alrededor de 25° y 35°C, siendo la temperatura de incubación preferida de unos 28°C. Después de una incubación de alrededor de 4 a 6 días, el caldo de fermentación se filtra y se recupera el antibiótico mediante extracción.

5.

Después de completada la fermentación puede utilizarse una variedad de procedimientos para aislar y purificar los homólogos. Los procedimientos apropiados de aislamiento y purificación incluyen técnicas de extracción de disolvente, tales como columnas de extracción por partidas o de extracción de líquido-líquido de flujo continuo de distribución a contracorriente y cromatografía de permeabilidad de gel en un sistema no acuoso.

10.

15.

Las sales aceptables en farmacia de los homólogos pueden prepararse siguiendo métodos convencionales. Estas sales se preparan a partir de la forma de ácido libre del antibiótico o de sus derivados siguiendo métodos bien conocidos en el arte, por ejemplo, mediante lavado del ácido libre en solución con una base o sal apropiada. Ejemplos de estas substancias básicas aceptables en farmacia aptas para formar sales para los fines del presente invento incluyen bases alcalinometálicas tales como hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido lítico y similares; bases metálicas alcalinotérreas tales como hidróxido cálcico, hidróxido de bario y similares; e hidróxido amónico. Las sales metálicas de metal alcalino o alcalinotérreas apropiadas para formar sales aceptables en farmacia pueden incluir aniones tales como carbonatos, bicarbonatos y sulfatos.

20.

25

La actividad antibiótica relativa de los homó-

logos de lasalocida B, C, D y E in vitro probada contra el organismo Bacillus TA se calculó comparando una lasalocida A antibiótica pura y los cuatro homólogos utilizando la técnica de difusión de copa-placa de agar. Los valores calculados de los cinco componentes se basaron sobre una actividad de 100 para la base de lasalocida A y se exponen en la tabla que sigue :

	<u>C o m p u e s t o</u>	<u>Actividad calculada in vitro</u> <u>frente a Bacillus TA</u>
10.	Lasalocida A	100
	Homólogo de lasalocida B	90
	Homólogo de lasalocida C	180
	Homólogo de lasalocida D	160
	Homólogo de lasalocida E	170

15. Las composiciones coccidiostáticas de este invento que contienen en calidad de ingrediente activo homólogos de lasalocida A antibiótica o sus sales aceptables en farmacia se preparan mezclando el ingrediente activo con un ingrediente inerte. El ingrediente inerte puede comprender un alimento, materias de relleno y similares. Por el término "ingrediente inerte" se entiende un material que no actúa como agente antiparasitario, por ejemplo un coccidiostato, es inactivo con respecto al ingrediente activo y puede ser ingerido sin peligro por los animales que han de tratarse y, por tanto, dicho material inerte es uno

20.

25. que resulta inactivo para los fines del presente invento.

El ingrediente activo, cuando se administra por vía oral a aves domésticas susceptibles a la coccidiosis, particularmente pavos y gallinas, como un componente del

alimento, controla de forma efectiva la enfermedad previniéndola o curándola después que surja. Además, las aves tratadas mantienen su peso o ganan peso en comparación con los testigos. Así pues, las composiciones de este invento

5. no solo controlan la coccidiosis, sino que también contribuyen a mejorar la eficacia de conversión del alimento en ganancias de peso.

La actual concentración del ingrediente activo en el alimento de los animales puede, evidentemente, ajustarse a las necesidades individuales y puede variar dentro de una amplia gama. El criterio del límite de la concentración es aquél cuando la concentración mínima es tal que se proporciona una cantidad suficiente de ingrediente activo para lograr el control deseado de la coccidiosis y la

10. concentración máxima es aquella en la que la cantidad de composición ingerida no produce ningún efecto desfavorable o indeseable.

15.

Así pues, por ejemplo, una mezcla previa alimenticia o alimento completo contiene suficiente ingrediente activo para proporcionar de alrededor del 0,006 % a alrededor del 0,03 % en peso del consumo alimenticio diario. De preferencia se utiliza de alrededor del 0,015 % a 0,03% en peso. Por lo general, alrededor del 0,015 % del ingrediente activo es suficiente para la finalidad de controlar y combatir la coccidiosis. Las cantidades superiores a

20. 0,015 %, si bien son efectivas contra la coccidiosis no ofrecen, por lo general, resultados mejorados sobre el 0,015 % y, en ciertos casos, pueden afectar de forma adversa el crecimiento, la eficacia del alimento y la mortali-

25.

dad.

- Si bien cantidades sobre 0,03 % son eficaces para combatir la coccidiosis, esta cantidad es el límite superior preferido debido a razones económicas, o sea, el
5. coste por unidad de efectividad es el más bajo dentro de esta gama. Las cantidades inferiores a 0,006 % no son efectivas para combatir la coccidiosis. Se prefiere un límite inferior de 0,015 % debido a que ello asegura la eficacia. La cantidad más preferida, o sea, alrededor de 0,015 % en
10. peso del consumo alimenticio diario de las aves es particularmente eficaz ya que proporciona el máximo efecto con la mínima dosis.

- El nivel de dosificación óptima variará, evidentemente, según sea el tamaño del animal. Cuando se utilizan
15. los antibióticos de conformidad con el invento para tratar o prevenir la coccidiosis, pueden componerse o mezclarse primero con un ingrediente alimenticio o vehículo para formar una mezcla previa de aditivo alimenticio, un concentrado alimenticio o un suplemento de aditivo alimenticio. Un aditivo alimenticio, concentrado o mezcla
20. previa es un producto destinado a diluirse para producir un alimento completo o sea, un producto destinado a administrarse como una ración única. Un suplemento de aditivo alimenticio es un producto destinado para ser consumido por
25. el animal directamente o que puede diluirse ulteriormente para producir un alimento completo o puede ingerirse y usarse como un suplemento para otras raciones. Los suplementos de aditivos alimenticios concentrados y mezclas previas

- contienen un porcentaje relativamente grande de coccidiostatos, o sea, el ingrediente activo para un vehículo apropiado y mezclado de modo que se obtenga una dispersión sustancialmente uniforme del coccidiostato en el vehículo. Los
5. vehículos apropiados son sólidos inertes con respecto al ingrediente activo y que pueden ingerirse sin peligro por los animales que han de tratarse. Ejemplos típicos de estos vehículos son los piensos comerciales para volatería, granos cereales molidos, subproductos de granos, concentrados
 10. proteínicos de plantas (soja, cacahuètes, etc.), subproductos de fermentación, sal, cal, compuestos inorgánicos y similares o sus mezclas. Las dispersiones líquidas pueden prepararse utilizando agua o aceite vegetal incluyendo, de preferencia, un agente tensoactivo, un agente emulgente y
 15. similares, en la dispersión líquida tal como ácido etilendiamina-tetraacético, etc., y solubilizantes. Cualquier vehículo apropiado o material de relleno puede actuar como el ingrediente inerte en forma sólida del agente antiparasitario siempre que sea inerte frente al material activo
 20. y no sea tóxico para el animal que debe recibir la administración.

- El ingrediente activo puede combinarse, para formar una masa, pellas y cualquier configuración deseada, con el material sólido de vehículo o relleno inerte siguiendo
25. cualquier técnica apropiada. Por ejemplo, pueden formarse composiciones molturando finamente o pulverizando el ingrediente activo y el ingrediente inerte con el empleo de cualquier molturadora o pulverizadora comercialmente disponible, con o sin estar presente el material alimenticio. Cuan-

do el material alimenticio no se halle presente al efectuarse la molienda o pulverización, el material resultante puede distribuirse, de conformidad con el presente invento, en cualquier material alimenticio disponible apropiado.

5. Los alimentos para aves típicos que pueden medicarse con el ingrediente activo de este invento pueden contener diversos ingredientes, por ejemplo, pueden contener productos de grano de elevada energía, tales como, maíz, trigo, cabezuela de trigo, milo, avena o similares; productos de grano de media y baja energía, tales como avenas, cebada
10. harina de trigo, acemite, acemite corriente o similares; grasas estabilizadas; proteínas vegetales tales como gli-cina, gluten de maíz, cacahuete o similares; proteínas animales tales como pescado, solubles de pescado, despojos
15. cárnicos, o similares; fuentes de UGT (factor de creci-miento sin identificar) y otros vehículos de vitamina B tales como productos lácteos secos, lavaduras secas, solu-bles secos de destilaciones, solubles de fermentación o similares; alfalfa deshidratada y diversos aditivos espe-ciales tales como riboflavina adicional, vitamina B₁₂, pan-totenato cálcico, niacina, colina, vitamina K y vitamina
20. E o similares, así como vitamina A estabilizada, vitamina D₃ (esteroles animales D-activados); suplementos de cálcico y fósforo tales como fosfato dicálcico, huesos vapori-zados, fosfato defluorado, piedra caliza o similares;
25. sal yodada, sulfato de manganeso, carbonato de zinc, un suple-mento alimenticio antibiótico; metionina o su análogo hi-droxi y un antioxidante.

Según resulta evidente de cuanto antecede, las

composiciones coccidiostáticas están destinadas para la ingestión oral. Estas composiciones pueden adicionarse al pienso alimenticio normal del animal tratado o pueden administrarse siguiendo otros métodos, tales como incorporando éstas en una pastilla, píldora o bolo y suministrarse forzosamente al animal. La administración del ingrediente activo debe considerarse en término del animal específico bajo las prácticas agrícolas encontradas.

10. Los compuestos del invento y su empleo como coccidiostatos se ilustra en los ejemplos siguientes :

EJEMPLO 1

Preparación de homólogos de lasalocida B, C, D y E.

15. El organismo estreptomices se desarrolló en cultivo sumergido y aireado en matraces sacudidos. El pH del caldo se ajustó a 6,5-7,5 mediante la adición de solución de KOH y luego se esterilizó el caldo. Se empleó un tanque de fermentación y en el tanque se utilizó un inóculo al 5-10 % constituido por un cultivo sumergido de 3 días precedente de botellas aireadas. El medio estuvo constituido
20. por harina de soja al 2%, azúcar moreno al 2%, K_2HPO_4 al 0,1 % y licor de maíz al 0,5%. La fermentación se llevó a cabo a 28°C bajo presión de aire positiva, con flujos de aire de 5-10 pies cúbicos de aire por minuto y por 40-80 galones de carga de líquido. El caldo se cosechó después
25. de 4 a 6 días de fermentación, se filtró y se recuperó el antibiótico por extracción. La extracción se llevó a cabo como sigue :

Se filtraron 204 litros de caldo y se suspendió la torta de filtración húmeda en 100 litros de acetato

n-butílico y se agitó la mezcla durante una noche a la temperatura del ambiente. Luego se filtró la mezcla y se separó la fase acuosa y se descartó. La solución de acetato de n-butilo, ensayando unidades de 30 millones de Bacillus E, se concentró en vacío hasta 3 litros, se lavó con solución de carbonato sódico al 10% y se secó con sulfato sódico anhidro.

- 5.
- Después de ulterior concentración hasta 300 cc y dilución con 350 cc de éter de petróleo (punto de ebullición 50-60°C) se separaron 41 g de material sólido, ensayando 25 millones de unidades de Bacillus E. Este material sólido se extrajo luego en un aparato Soxhlet con 4 litros de éter de petróleo (punto de ebullición 50-60°C) durante 40 horas. Se recogió el extracto hasta sequedad en vacío, se suspendió el residuo cristalino en éter de petróleo y se filtró. La cristalización repetida dió aguas madres enriquecidos en homólogos.
- 10.
- 15.

EJEMPLO 2

Aislamiento de homólogos de lasalocida B, C, D y E.

- 20.
- Se cromatografió una porción (igual a 22 g de sólidos) de las aguas madres finales, procedente de la preparación a gran escala del ejemplo 1, en un aparato de distribución a contracorriente de 200 tubos (cada uno con una capacidad de 80 cc). Se disolvió la muestra en 160 cc de las fases mixtas (heptano-acetato de etilo-metanol-agua, 27:18:18:2) y se introdujo la solución en los dos primeros tubos. Después de 380 transferencias se evaporaron las siguientes fracciones y los sólidos recuperados después de la evaporación se identificaron como :
- 25.

- A. Mezcla de homólogos de lasalocida B, C, D y E
- B. Lasalocida A
- C. Isolasalocida A. Esta es un isómero de Lasalocida A que tiene una estructura distinta a las lasalocidas A-E.

5.

La fracción A se disolvió en 20 cc de las fases mixtas del sistema disolvente de heptano-acetato de etil-
etanol-agua-ácido acético glacial (10:5:9:3:1) y se sometió a cromatografía en un aparato de distribución a con-
tracorriente de 500 tubos. Después de 2800 transferencias se separaron 200 mg aproximadamente de cada una de las
lasalocidas B, C, D y E y con el análisis ofrecieron los puntos de fusión siguientes:

10.

Lasalocida B - Punto de fusión 85-87° C

15.

Lasalocida C - Punto de fusión 97-100° C

Lasalocida D - Punto de fusión 102-104° C

Lasalocida E - Punto de fusión 90° C

EJEMPLO 3

Sal sódica del homólogo de lasalocida E.

20.

Se disolvieron aproximadamente 100 mg de lasalocida E en cloruro de metileno y se trató con una solución saturada de carbonato sódico acuoso. La concentración de la fase disolvente con hexano dió 104 mg de la sal sódica de lasalocida E cristalina (punto de fusión 182-182,5°C).

25.

EJEMPLO 4

Este ejemplo ilustra la utilización de una mezcla de coccidiostatos antibióticos en un pienso animal. Un pienso medicado para aves destinado como un alimento de partida para pollos se prepara :

Combinando 0,015 % en peso y 0,006 % en peso de una mezcla de lasalocida B y C (50/50) y lasalocida D y E (50/50) en una ración básica para aves constituida por :

	<u>Ingredientes</u>	<u>Unidades de peso</u>
5.	Maíz, nº 2 amarillo molido	1,123 libras/ton
	Grasa estabilizada o aceite vegetal	60 "
	Aceite de soja (proteína al 50% con bajo contenido de fibra)	480 "
	Gluten de maíz	50 "
10.	Pescado, tratado con antioxidante, proteínas al 60 %	30 "
	Solubles de pescado secos	10 "
	Despojos de carne y huesos, proteínas al 50 %	140 "
15.	Solubles secos de destilados de maíz	50 "
	Alfalfa, proteínas al 17% 100.000 A/lb	30 "
	Sulfato de manganeso de calidad alimenticia	0,75 "
20.	Carbonato u óxido de zinc	0,25
	Riboflavina	3 gramos
	Vitamina B ₁₂	6 mg.
	Pantotenato cálcico	5 gramos
	Niacina	30 "
25.	Vitamina A estabilizada	6.000.000 de unidades de la USP
	Vitamina D ₃	650.000 I.C.
	Acetato de vitamina E	5.000 I.C.

- | | | |
|----|---|-----------------|
| | Vitamina K (bisulfito sódico de ma -
nadona) | 2 gramos |
| | DL-metionina o análogo hidroxí | 1 libra/ton |
| 5. | Antioxidante (etoxiquina o hidro-
xi-tolueno butilado) | 0,25 libras/ton |

Infección de Eimeria tenella en gallinas de laboratorio.

- Método de prueba - Esta prueba utiliza diez ga -
llinas por grupo de farmaco. Se utilizan diez gallinas co -
mo un control de peso y diez gallinas como un control in -
fectado. El farmaco se administra 48 horas antes de la in -
fección. Se mezcla un gramo del farmaco de prueba en una
mezcladora mecánica con una cantidad suficiente de pienso
para gallinas para que resulte la dosificación deseada. La
infección consiste en la administración oral mediante pipe -
ta de unos 200.000 oocistos. La prueba se prolonga por on -
ce días y luego se realiza la autopsia de las aves super -
vivientes y se examina la existencia de lesiones importan -
tes en la ceca. Las aves de prueba se evalúan según el nú -
mero de supervivientes y el número de lesiones. Los resul -
tados se expresan como el grado medio de infección (A.D.I.)
Un grado medio de infección inferior a 1,5 se considera
significativo.

- Según puede apreciarse por los datos de la ta -
bla que sigue, la mezcla de antibióticos es efectiva a las
dosis ilustradas para el tratamiento de la coccidiosis.

	Compuesto	Dosis en el pienso	Grado medio de infección	Mortalidad porcentual
	Control sin tratar y sin infectar	ninguna	0,0	0
5.	Control sin tratar infectado	"	2,6-2,8	10-20
	Homólogo de lasalocida B	} mezcla en una relación 1:1	0,015	1,0
	Homólogo de lasalocida C			
	Homólogo de lasalocida D	} Mezcla en una relación 1:1	0,015	0,0
10.	Homólogo de lasalocida E			

EJEMPLO 5

15. Este ejemplo ilustra el empleo de un solo coccidiostato antibiótico en un pienso para animal. Un pienso para aves medicado destinado como un pienso de partida para pollos se prepara como en el ejemplo 4. Alrededor de 0,01% en peso de lasalocida D se combina con una ración para aves básica como la utilizada en el ejemplo 4. Se sigue el método de prueba utilizado en el ejemplo 4 para investigar la actividad contra Eimeria Tenella. Según puede apreciarse por los datos de la tabla el antibiótico es efectivo a la dosificación preferida ilustrada para el tratamiento de la coccidiosis.

20.

Compuesto	Dosis en el pienso	Grado medio de infección	Mortalidad porcentual
Control sin tratar y sin infectar	ninguna	0,0	0

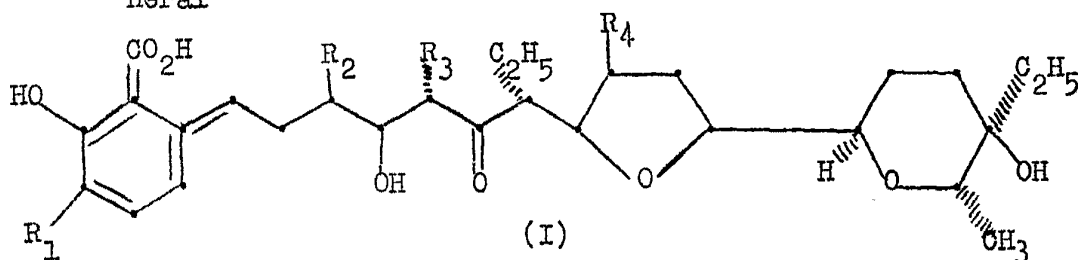
Compuesto	Dosis en el <u>pienso</u>	Grado medio <u>de infección</u>	Mortalidad <u>porcentual</u>
Control sin tratar in-			
fectado	ninguna	3,0	20
Homólogo de lasalocida D	0,01	0,5	0

= . =

N O T A

10. Descrito el objeto del presente invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones con prioridad de la solicitud de patente U.S.A. núm. 457.296 del 2 de Abril de 1974.

15. 1. Un procedimiento para la preparación de nuevos antibióticos homólogos de la lasolicida de la fórmula general



en la que

20. R_1, R_2, R_3 y R_4 se eligen del grupo constituido por metilo y etilo, con la salvedad de que uno solo de R_1-R_4 es etilo,

en forma aislada, así como sus sales aceptables en farmacia, caracterizado porque comprende cultivar un micro-

25. organismo comprendido en la especie streptomyces X-537 en

un medio nutriente acuoso que contenga fuentes asimilables de carbohidrato y nitrógeno bajo condiciones aeróbicas sumergidas hasta que se imparte sustancial actividad antibiótica a dicho medio, aislar los compuestos de la fórmula I así producidos de dicho medio acuoso y, convertir, si se desea, un producto obtenido en una sal respectiva aceptable en farmacia.

5.

2.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el organismo utilizado es streptomyces X-537, NRRL 3382.

10.

3.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el cultivo de streptomyces X-537 se lleva a cabo a un pH comprendido entre alrededor de 6,5 y alrededor de 7,5 y a una temperatura comprendida entre alrededor de 25°C y alrededor de 35°C.

15.

4.- Un procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el cultivo se lleva a cabo en presencia de una grasa o aceite vegetal o animal.

20.

5.- Un procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la recuperación de los productos finales se lleva a cabo filtrando el medio acuoso, extrayendo el filtrado con un disolvente inmiscible en agua para los antibióticos y separando el producto final del extracto de disolvente.

25.

6.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque el filtrado se extrae con n-butil-acetato y el extracto se trata con éter de petróleo para obtener unas aguas madres enriquecidas em

los productos finales deseados.

5. 7.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 5 o 6, caracterizado porque la separación de los productos finales del extracto de disolvente se efectúa sometiendo éste último a distribución en contra-corriente.

10. 8.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque la distribución en contra-corriente se efectúa utilizando como medio disolvente heptano-acetato de etil-metanol-agua y sometiendo la fracción que contiene los productos finales deseados a otra distribución en contra-corriente utilizando como medio disolvente heptano-acetato de etilo-etanol-agua-ácido acético glacial.

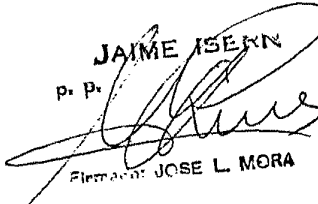
15. 9.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque el medio disolvente para la primera distribución en contra-corriente está constituido por heptano-acetato de etilo-metanol-agua en una relación volumétrica de alrededor de 27:18:18:2 y el medio disolvente para la segunda distribución en contra-corriente está constituido por heptano-acetato de etilo-etanol-agua-ácido acético glacial en una relación volumétrica de alrededor de 10:5:9:3:1.

25. 10.- Un procedimiento para la preparación de nuevos antibióticos homólogos de la lasolicida A.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 23 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 1 de Abril de 1975

P.a.

JAIME ISERN
p. p.

Firmado: JOSE L. MORA