

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la memoria adjunta.

PATENTE DE INVENCION

(10) ES	(11) NUMERO	(19) A1
	(21)	476.300
(22)	FECHA DE PRESENTACION	
	29-12-78	

(30) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO		
53448/77 18269/78	22 de diciembre de 1.977 8 de mayo de 1.978	Inglaterra. Inglaterra.

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(52) PATENTE DE LA QUE ES DERIVADIVA
	C12D; A23K	

(54) TITULO DE LA INVENCION

Procedimiento de obtención de compuestos promotores del crecimiento de animales rumiantes.

(71) SOLICITANTE (ES)

IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

Imperial Chemical House, Thames House North, Millbank, Londres SW1P 3JF, Inglaterra.

(72) INVENTOR (ES)

DAVID HUW DAVIES.  
GEOFFREY LIGHFOOT FLOYD.

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE

D. JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO Y POMBO.

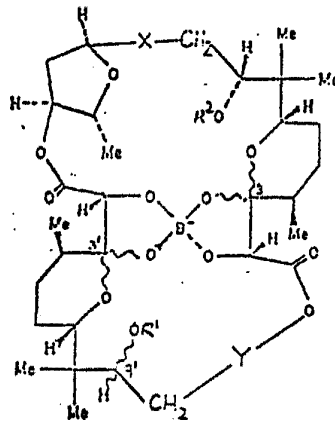
Esta invención se relaciona con un procedimiento de obtención de nuevos compuestos químicos de utilidad en la crianza de animales rumiantes domésticos, por ejemplo, ganado, ovejas, cabras y ciervos, al objeto de reducir la proporción de metano producido por la fermentación ruminal y aumentar la proporción de ácido propiónico en el fluido de la panza, mejorando con ello su proporción de crecimiento o la eficacia de su conversión alimenticia, o bien ambos factores.

En los animales rumiantes, una proporción significativa de la entrada de energía en bruto, en forma de alimentos, se pierde en forma de metano, el cual se forma durante la fermentación del alimento en la panza, perdiéndose también, como calor de fermentación, otra proporción significativa de la entrada de energía en bruto. Por ejemplo, en los corderos la producción de metano puede ascender a un 10 % aproximadamente de la entrada de energía en bruto, ascendiendo el calor de fermentación a un 6 % más. Los compuestos obtenidos por el procedimiento de esta invención tienen el efecto de aumentar la proporción de ácido propiónico en el fluido de la panza y, en particular, tienen el efecto de aumentar la proporción de ácido propiónico a espensar de metano y/o ácido acético. Esto es conocido como un efecto deseable en la nutrición de rumiantes, debido a que el ácido propiónico es un precursor mucho más eficaz de glucosa, a partir de la cual el animal deriva su energía y crecimiento, que el ácido acético; mientras que parte de la entrada alimenticia en los animales, que se convierte a metano, se pierde simplemente para el animal, siendo excretado el metano por erupción. De este modo, la modificación del metabolismo de la panza conseguida por los compuestos obtenidos según esta invención constituye un efecto de gran utilidad, creyéndose que

aumenta la velocidad de crecimiento y la eficacia de conversión de alimentos de los animales rumiantes.

De este modo, y de acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento para preparar un compuesto de fórmula:

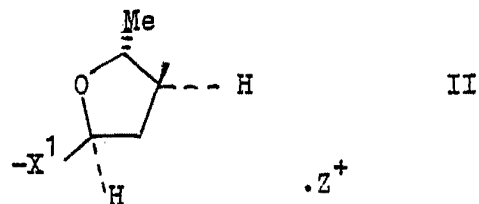
5



en la que  $R^1$  y  $R^2$  son cada uno un átomo de hidrógeno o un radical acetilo;

y los átomos de carbono 3, 3' y 9' se encuentran todos ellos en la configuración R, X es un radical etileno o trans-vinileno e Y es un radical  $Y^1$  de fórmula:

10

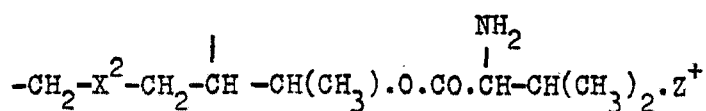
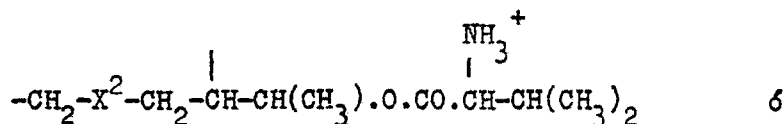


en la que  $X^1$  está enlazado al grupo  $CH_2$  y el átomo de carbono del anillo está enlazado al átomo de oxígeno, y en donde  $X^1$  es un radical etileno o trans-vinileno, y  $Z^+$  es un ión sodio, potasio, litio, cesio o amonio, o un ión de fórmula  $R^3R^4R^5R^6N^+$  en donde cada radical  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  y  $R^6$  es hidrógeno o alquilo con 1 a 6 átomos de carbono;

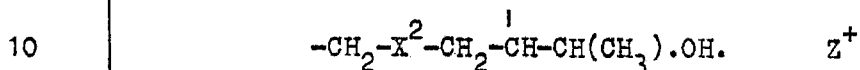
15

o los átomos de carbono 3, 3' y 9' se encuentran todos ellos

en la configuración S, X es un radical etileno e Y es un radical Y<sup>2</sup> de fórmula:



5 en donde el grupo CH<sub>2</sub> está enlazado al grupo CH<sub>2</sub> mostrado en la fórmula I, y el grupo CH está enlazado al átomo de oxígeno, y en donde X<sup>2</sup> es un radical etileno o cis-vinileno; o los átomos de carbono 3, 3' y 9' se encuentran todos ellos en la configuración S, X es un radical etileno e Y es un radical Y<sup>3</sup> de fórmula:



en donde X<sup>2</sup> y Z<sup>+</sup> se definen como anteriormente.

15 Como ya se ha indicado anteriormente, los compuestos obtenidos por el procedimiento de esta invención son de utilidad para aplicarse, bien como tales o bien en forma de composiciones, en la crianza de animales rumiantes domésticos, por aplicación oral a los mismos de los citados compuestos o composiciones.

Compuestos particulares de fórmula I que pueden ser obtenidos por el procedimiento de esta invención son:

- 20 1. aplasmomicina (3R, 3'R, 9'R, R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H, X = trans-vinileno, Y = Y<sup>1</sup> en donde X es trans-vinileno y Z es sodio). Este compuesto es un metabolito aislado de la fermentación de la cepa Streptomyces griseus 3S-20, tal y como describe Okami et al., The Journal of Antibiotics, 1976, volumen

XXIX, páginas 1019 a 1025, y Kitahara, ibid, 1977, volumen XXX, páginas 714 a 719. Esta cepa está depositada en el Fermentation Research Institute, Chiba, Japón, con el número de referencia FERM-P No. 3448;

- 5 2. ICI.122,378, un metabolito aislado de la fermentación de S. griseus, cepa depositada en el National Collection of Bacteria, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Torry Research Station, 135 Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, Escocia, con el número de referencia NCIB 11371. Este material es idéntico a la aplasmomicina;
- 10 3. boromicina (3S, 3'S, 9'S,  $R^1=R^2=H$ , X = etileno, Y = Y<sup>2</sup> en donde X<sup>2</sup> es cis-vinileno). Este compuesto es un metabolito aislado de la fermentación de S. antibioticus (Waksman y Woodruff) cepa ETH 28829, como describe
- 15 Hutter et al., Helvetica Chimica Acta, 1967, volumen 50, páginas 1533 a 1539, y Dunitz et al., ibid., 1971, volumen 54, páginas 1709 a 1713. Esta cepa está también depositada en el United States Department of Agriculture, Peoria, Illinois, U.S.A., con el número de referencia
- 20 NRRL 3207;
4. Factor B, un compuesto de fórmula molecular  $C_{42}H_{62}BNaO_{15}$  que es un co-metabolito de aplasmomicina en la fermentación de S. griseus, NCIB 11371, y es un derivado monoacetílico de la misma, en donde la estereoquímica relativa puede o no ser igual que en la aplasmomicina;
- 25 5. Factor C, un compuesto de fórmula molecular  $C_{44}H_{64}BNaO_{16}$  que es un co-metabolito de aplasmomicina en la fermentación de S. griseus, NCIB 11371, y es un derivado diacetílico de la misma, en donde la estereoquímica relativa
- 30 puede o no ser igual que en la aplasmomicina.

En la aplicación de los compuestos obtenidos por

el procedimiento de esta invención, los compuestos de fórmula I se administran preferiblemente por vía oral a los animales como un suplemento de su dieta normal, es decir, en mezcla con un alimento sólido ordinario, en bloques alimenticios o en los  
5 lamaderos de sal, disueltos o suspendidos en el agua de beber o, para animales jóvenes tales como corderos o terneros, disueltos o suspendidos en leche entera o en leche desnatada. El compuesto de fórmula I se incorpora en alimentos, bloques de alimentos, lamaderos de sal, agua de bebida, leche entera o leche  
10 descremada, en un grado tal que cada animal tratado ingiera de 0,01 a 30 mg/kg de peso corporal por día, preferiblemente de 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal por día, del compuesto de fórmula I.

Alternativamente, el compuesto de fórmula I se  
15 puede administrar oralmente a los animales en forma de un pellet o bolus intra-ruminal de efecto retardado, de modo que el animal absorba una cantidad similar por día del compuesto de fórmula I.

Los animales pueden recibir un compuesto de fórmula  
20 I durante prácticamente la totalidad de su periodo de crecimiento o durante solamente una parte del mismo, por ejemplo la primera edad y/o el periodo que conduce a la matanza. El aumento de la velocidad de crecimiento conseguido por la administración de los compuestos obtenidos según esta invención, permite que  
25 los animales que han de ser sacrificados para carne lleguen al mercado con un peso superior al normal y en un periodo de crecimiento más corto, o permite la producción de animales más pesados al final del periodo de crecimiento normal. La eficacia mejorada de la conversión alimenticia conseguida por la aplicación de los compuestos de esta invención permite que los anima-  
30

les tratados alcancen cualquier peso deseado consumiendo menos alimentos que los animales sin tratar y desarrollados hasta el mismo peso. En los niveles de inclusión que promocionan un crecimiento óptimo, no se observó indicación alguna de efectos tóxicos debidos a la aplicación del compuesto de fórmula I.

Como ya se ha dicho anteriormente, los compuestos obtenidos por el procedimiento de esta invención pueden aplicarse a la crianza de animales rumiantes domésticos, por vía oral, bien como tales o bien en forma de composiciones que comprenden un compuesto de fórmula I como anteriormente se ha definido junto con un diluyente o vehículo ingerible, sólido o líquido, no tóxico.

Un diluyente o vehículo líquido adecuado es, por ejemplo, el agua de beber, leche entera o leche desnatada.

Un diluyente o vehículo ingerible sólido, no tóxico, adecuado, puede ser, por ejemplo, un alimento para rumiantes nutricionalmente equilibrado, convencional, por ejemplo, una dieta típica para ganado u ovejas consistente en productos cereales, tales como harina de cebada, harina de maíz o alimentos de trigo, productos de nueces y semillas, tales como tortas de nueces molidas sin corteza o tortas de semillas de algodón o bien torta de semillas de algodón extractadas, junto con cantidades menores de, por ejemplo, harina de plumas, harina de algas marinas, harina de huesos, creta, sal, urea, molasas, vitaminas y trazas de minerales, o bien puede ser un diluyente o vehículo sólido inerte sin valor nutricional, por ejemplo, caolín, talco, carbonato de calcio, tierra de batán, arcilla de atapulgita, conchas de ostras molidas o tierra caliza molida; o bien puede ser almidón o lactosa.

Las citadas composiciones pueden tener la forma de

un alimento suplementado para la alimentación directa de los animales, en cuyo caso contendrá de 5 a 3.000 ppm de un compuesto de fórmula I en mezcla con un alimento convencional para rumiantes; o puede tener la forma de una premezcla concentrada para su dilución con un alimento convencional de rumiantes al objeto de producir un alimento suplementado adecuado para la alimentación de los animales, conteniendo dicha premezcla de 0,3 a 50 % p/p de un compuesto de fórmula I en mezcla con un alimento para rumiantes nutricionalmente equilibrado, convencional, un diluyente sólido inerte sin valor nutricional, por ejemplo piedra caliza molida, o almidón o lactosa.

Dichas composiciones se preparan mediante mezcla uniforme del compuesto de fórmula I con el citado diluyente o vehículo ingerible, sólido, no tóxico.

El compuesto de fórmula I se diluye preferentemente en serie con un diluyente o vehículo en dos o más etapas sucesivas, para asegurar un mezclado homogéneo.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para la producción de un compuesto de fórmula I en donde  $R^1$  y  $R^2$  son cada uno un átomo de hidrógeno o un radical acetilo, X es trans-vinileno ó Y es un radical  $Y^1$  en donde  $X^1$  es trans-vinileno y  $Z^+$  es un ión sodio, caracterizado porque comprende cultivar una cepa o mutante de Streptomyces griseus productor de aplasmomicina en un medio nutriente acuoso, que contiene fuentes de carbono, nitrógeno y boro asimilables y una sal sódica, bajo condiciones aeróbicas, a una temperatura comprendida entre 10 y 37°C; filtrar el cultivo; y aislar el producto del filtrado por medios convencionales.

En el procedimiento de la invención, una fuente adecuada de carbono asimilable es, por ejemplo, un alcohol polihídrico, por ejemplo glicerol, glucosa, xilosa, arabinosa, ramnosa,

fructosa, galactosa, manitol o inositol, y una fuente de carbono preferida es jarabe de glucosa, el cual se incorpora convenientemente en el medio en una proporción de 1 a 5 % p/v.

5 Una fuente adecuada de nitrógeno asimilable es, por ejemplo, peptona, la cual se incorpora convenientemente en una proporción de 0,05 a 2 % p/v.

10 El medio nutriente puede contener adicionalmente cantidades pequeñas de otros elementos, tal como fósforo, en forma de, por ejemplo, dihidrógeno ortofosfato de potasio hidrógeno fosfato de diamonio; magnesio en forma de, por ejemplo, sulfato de magnesio o carbonato de magnesio; azufre en forma de, una sal sulfato, potasio en forma de, por ejemplo, cloruro yotásico, carbonato potásico o dihidrógeno ortofosfato de potasio; y cantidades de trazas de sales de elementos tales como cobre, 15 zinc, hierro, manganeso y molibdeno.

Una temperatura adecuada para la fermentación es de 28°C y el producto se puede aislar del filtrado de cultivo por medios convencionales, por ejemplo por extracción del filtrado con un disolvente orgánico inmiscible en agua sin ajustar el pH, seguido por evaporación del disolvente y cromatografía del residuo. 20

Esta invención proporciona la cepa Streptomyces griseus depositada en el National Collection of Industrial Bacteria y designada con el número NCIB 11371, así como sus variantes y mutantes. Este organismo es adecuado para utilizarse en el procedimiento de la invención y tiene las siguientes características descriptivas: 25

Los medios utilizados son preparados de acuerdo con las recetas de "International Streptomyces Project (ISP y son como se describe por Shirling, E.B. & Gottlieb, D (1966) en "Methods for characterisation of Streptomyces species" en International Journal of Systematic Bacteriology, 16, (3), 313-340. 30

Condiciones de incubación -

Temperatura 30°C. Crecimiento oscuro.

ISP2 Extracto de levadura/Extracto de malta

- 5 4 días 3-4 mm - "colonias cristalinas", de buena altura, rugosas. Color cervato oscuro. Inverso - gris parduzco.
- 10 días 10 mm - Crecimiento sumergido en el borde con colonias de color cervato/gris, claras, con altura y rugosas. Inverso sin cambios. Ningún color en agar.

ISP3 Agar de harina de avena

- 10 4 días 1-2 mm - Colonias finas, claras, a veces con una cavidad rasgada en el centro. Inverso - gris/cervato muy pálido.
- 10 días 4-6 mm - Colonias cereas-fermentadas, lisas de color cervato-gris. Inverso: sin cambios. Color marrón muy evidente impartido al agar.

15 ISP4 Sales inorgánicas-Agar de almidón

- 4 días 1-2 mm - Colonias claras, húmedas, hermeticamente compactas. Color cervato pálido. Inverso: cervato/gris pálido.
- 10 días - Pequeño crecimiento adicional. Colonias cereas, ligeramente elevadas, rugosas con bordes desiguales. Color cervato pálido. Inverso sin cambios. Ningún color al agar.

20 ISP5 Glicerol-Agar de asparagina

- 4 días 1-2 mm - Colonias elevadas. Rugosas. Agar deprimido en el margen de la colonia. Color cervato cristal. Inverso: color cervato-gris pálido.
- 25 10 días 3-5 mm - Colonias cereas, elevadas y rugosas. Color cervato amarillento. Inverso: sin cambios.

ISP7 Agar de tirosina

- 30 4 días 2-3 mm. Colonias de buena altura, rugosas, de color cervato cristalino. Inverso: gris-marrón. Medio: vira a marrón claro.
- 10 días 10 mm - Colonias cereas, rugosas, de color cervato-gris amarillento/oscuro con algunas áreas de color gris polvo.

Inverso: marrón-gris oscuro, pero se detecta ciertas coloración del agar.

ISP9 Agar de utilización de carbono

Adición	4 días	10 días	Evaluación
Agua	1-2 mm. Sumergidas, muy finas "ahumadas"	Muy finas, "ahumadas" Sumergidas	-
Glucosa	1-2 mm. clara en lugar de un tipo similar a "pescado-jalea" gris cervato	2- 3 mm. colonias, herméticas, deseadas c <sup>e</sup> reas, de color gris cervato. Inverso: sin cambios	++
Arabinosa	Ligeramente mejor que en agua	Como en agua	-
Celulosa	Indeterminable	Como en agua	-
Fructosa	1 mm. Colonias herméticas, elevadas, "cristalinas", gris cervato. Inverso: gris cervato.	4-5 mm. Colonias herméticas, elevadas, c <sup>e</sup> reas, rugosas, agrietadas, de color gris-cervato	++
Inositol	Como en arabinosa	Ligeramente mejor que en agua	+ -
Manitol	2 mm. Colonias herméticas, elevadas, cristalinas, de color cervato, con centros desgarrados. Inverso: color cervato.	2-3 mm. Colonias herméticas, elevadas, c <sup>e</sup> reas, de color cervato. Inverso: color cervato.	++
Rafinosa	Como en arabinosa	Como en agua	-
Rannosa	Como en agua	Como en agua	-
Sucrosa	Como en agua	Como en agua	-

Adición	4 días	10 días	Evaluación
Xilosa	1-2 mm. Colonias muy finas, color cervato aterciopelado	2-3 mm. Colonias ligeramente elevadas, de color gris-cervato claro aterciopelado, posible esporangia	++

Tolerancia de temperatura

Sobre caldo de triptona-levadura (ISPl). A la menor temperatura ensayada, 19°C, el crecimiento es evidentemente bueno.

5 Alrededor de 28°C es mejor y no tolera temperaturas superiores a 37°C.

Morfología

10 Es una cepa de pobre esporangia, pero las esporas, cuando se observan, son de cadenas cortas, de paredes lisas y en forma de barriles.

Asimismo, y de acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento para preparar un nuevo compuesto de fórmula I en donde R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son cada uno un átomo de hidrógeno o un radical acetilo, y:

15 (a) los átomos de carbono 3, 3' y 9' se encuentran todos ellos en la configuración R, Y es un radical Y<sup>1</sup>, uno cualquiera de X y X<sup>1</sup> es un radical etileno y el otro es un radical trans-vinileno, o ambos X y X<sup>1</sup> son radicales etileno, y Z<sup>+</sup> se define como anteriormente; ó

20 (b) los átomos de carbono 3, 3' y 9' se encuentran todos ellos en la configuración R, X es un radical trans-vinileno, e Y es un radical Y<sup>1</sup> en donde X<sup>1</sup> es un radical trans-vinileno y Z<sup>+</sup> es un ion potasio, litio, cesio o amonio, ó un ión de fórmula R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>R<sup>5</sup>R<sup>6</sup>N<sup>+</sup> como anteriormente se ha definido; ó

(c) los átomos de carbono 3,3' y 9' se encuentran todos ellos en la configuración S, X es un radical etileno e Y es un radical  $Y^2$  en donde  $X^2$  es un radical etileno; ó

5 (d) los átomos de carbono 3,3' y 9' se encuentran todos ellos en la configuración S, X es un radical etileno e Y es un radical  $Y^3$  en donde  $X^2$  se define como anteriormente y  $A^+$  es un ion potasio, litio, cesio o amonio o un ion de fórmula  $R^3R^4R^5R^6N^+$  como anteriormente se ha definido:

El procedimiento de la invención comprende:

10 (i) para preparar los nuevos compuestos definidos en (a) anteriormente, la hidrogenación selectiva o no selectiva de un compuesto correspondiente de fórmula I en donde X y  $X^1$  son cada uno un radical trans-vinileno, sobre un catalizador de platino o paladio; ó

15 (ii) para preparar los nuevos compuestos definidos en (b) anteriormente, la fermentación de una cepa de S.griseus productora de aplasmomicina o productora de ICI 122.378, como anteriormente se ha definido, en presencia de una sal de potasio, litio, cesio, amonio o de  $R^3, R^4, R^5, R^6N^+$  en un medio nutriente acuoso; o

20 (iii) para preparar los nuevos compuestos definidos en (c) anteriormente, la hidrogenación, sobre un catalizador de platino o paladio, de un compuesto correspondiente de fórmula I en donde X es un radical etileno e Y es un radical  $Y^2$  en donde  $X^2$  es un radical cis-vinileno; o

25 (iv) para prepara los nuevos compuestos definidos en (d) anteriormente, la reacción de un compuesto de fórmula I en donde X es un radical etileno e Y es un radical  $Y^2$  con hidróxido de potasio, litio o cesio o bien carbonato de potasio, litio o cesio.

30 Naturalmente, debe entenderse que un compuesto de

fórmula I en donde  $Z^+$  tiene un determinado significado puede convertirse a un compuesto similar en donde  $Z^+$  tiene otro significado diferente, por métodos convencionales, por ejemplo utilizando resinas intercambiadoras de iones.

5                    La aplasmomicina y los Factores B y C muestran también actividad anticoccidial. Esta actividad viene demostrada por su acción en la prevención del crecimiento coccidial en cultivos de células de riñón de pollo inoculadas con esporozitos de acuerdo con el ensayo convencional descrito en Journal of Parasitology, 58, 664-668 (1972). En éste ensayo, la aplasmomicina muestra actividad contra Eimeria tenella a una concentración de 0,037 ppm pero solamente muestra efectos tóxicos sobre las células anfitrionas a una concentración de 9 ppm. Similarmente, la mezcla de Factores B y C muestra actividad contra E. tenella a una concentración de 0,012 ppm pero solamente muestra efectos tóxicos sobre las células anfitrionas a una concentración de 1 ppm.

La invención se ilustra, pero no se limita, por los siguientes ejemplos.

20                    EJEMPLO 1

Se desarrolla Streptomyces griseus NCIB 11371 como un cultivo inclinado sobre dextrina-agar (45 ml) durante 7 días a 30°C. Se raspa el tubo inclinado depositando su interior en 100 ml de agua esteril y la suspensión así obtenida se utiliza para inocular tres matraces de 500 ml conteniendo cada uno de ellos 50 ml del siguiente medio:

Harina de soja	1,5 % p/v
"Difco Bacto Casitone" (marca registrada)	0,1 % p/v
30    Nitrato sódico	0,3 % p/v

Jarabe de glucosa	2,0 % p/v
Carbonato cálcico	0,25 % p/v
Agua desionizada	hasta 100

5 el cual había sido pre-esterilizado introduciéndolo en un autoclave a una presión de 1,05 kg/cm<sup>2</sup> durante media hora, manteniéndose el pH en 7 aproximadamente.

10 Los tres matraces así preparados se sacuden a 27°C durante 75 horas en un sacudidor rotativo. El contenido de los tres matraces se combina entonces y se utiliza para inocular un fermentador de acero inoxidable que contiene 30 litros de medio esterilizado de la misma composición que la descrita anteriormente. El contenido del fermentador se agita a 27°C durante 88 horas, empleando una turbina con 4 paletas planas que giran a 350 rpm, y se airea a una velocidad de 7,5 litros por minuto. El caldo resultante se filtra a través de tierra de diatomeas y el lecho filtrante se lava con 3 litros de agua. El filtrado y los lavados se combinan (28 litros) y se extrae a su pH natural con acetato de etilo ( 1 x 9 litros y 1 x 7 litros). Los extractos de acetato de etilo se combinan, se secan con sulfato sódico y se filtran y el filtrado se concentra bajo presión reducida para producir 29 g de un residuo oleoso.

El producto requerido puede obtenerse a partir del concentrado anterior siguiendo uno cualquiera de los dos siguientes procedimientos:

25 (A) Se disuelven 29 g del residuo oleoso en el volumen mínimo de una mezcla disolvente de la siguiente composición: cloroformo (98 partes), metanol (una parte), ácido fórmico (una parte) y la solución se aplica a la parte superior de la columna de gel de sílice (90 cm x 7,5 cm)

30

5 preparada como una lechada con la misma mezcla  
disolvente. La columna se eluye con la misma  
mezcla disolvente recogiendo fracciones de  
10 500 ml después de haber salido el disolvente  
frontal de la columna. Las fracciones 4 y 5  
se combinan y el disolvente se evapora para dar  
3,5 g de una goma la cual se purifica adicional-  
mente por cromatografía de capa preparativa  
sobre sílice "Merck's "Kieselgel 60 F250" -  
10 marca registrada - 2 mm espesor) usando 30 %  
v/v de acetato de etilo en éter de petróleo  
(p.e. 60-80°C) como mezcla eluyente. La banda  
en  $R_F = 0,25$  (aproximadamente) se raspa de  
la placa y se extrae con acetato de etilo  
15 y el disolvente se evapora para dar 140 mg de  
un sólido cristalino blanco el cual se cristali-  
za en metanol acuoso y se seca bajo vacío du-  
rante 5 horas para dar ICI 122.378, sin punto  
de fusión definido,  $[\alpha]_D^{23} = +210^\circ$  (C = 0,5 en  
20 cloroformo). Análisis: Encontrado C = 60,1, H =  
7,7, Na = 2,8. Calculado para  $C_{40}H_{60}BNaO_{14}$ ,  
C = 60,2, H = 7,5, Na = 2,9 %. Espectro de masa  
 $M^+ = 798,396$ , calculado para  $C_{40}H_{60}BNaO_{14} =$   
798,396.  $R_F = 0,74$  (cromatografía de capa fina  
25 sobre placas de 0,25 mm 60 F-254 de Merck desa-  
rrolladas con 10 % v/v de metanol en cloroformo,  
visualizadas como una mancha de color marrón  
después de la pulverización con ácido sulfúrico  
3N y calentamiento a 100°C, ó como una mancha  
30 de color rosa rojizo después de la pulverización

con una solución de ácido carmínico en ácido sulfúrico 3N y calentamiento a 70°C durante 5 minutos).

(B)

5

10

15

20

25

El residuo oleoso (60 g), del extracto de acetato de etilo obtenido a partir de una fermentación similar de 80 litros, se disuelve en 400 ml de metanol y la solución se sacude con éter de petróleo (p.e.60-80°C, 800 ml). La fase inferior (capa de metanol) se separa y concentra bajo presión reducida para dar 24 g de una goma que se disuelve en el volumen mínimo de una mezcla de acetato de etilo (35 partes) y éter de petróleo (p.e. 60-80°C, 65 partes) y se aplica a la parte superior de una columna de gel de sílice (51 x 4,5 cm; 450 g) preparada como una lechada con la misma mezcla disolvente. Se recogen las fracciones de 25 ml después de salir de la columna el disolvente frontal, se combinan las fracciones 25-70 y el disolvente se evapora para dar 3,3 g de una goma viscosa. Esta goma se purifica adicionalmente por cromatografía de capa preparativa sobre sílice (como se ha descrito anteriormente en A) para dar 300 mg de ICI 122.378 puro idéntico al material obtenido en el proceso A anteriormente.

#### EJEMPLO 2

A continuación se demuestra la capacidad de ICI 122.378 para inhibir la producción de metano en la panza de animales rumiantes y para aumentar la proporción de propionato(Ac/Pr) y de butirato (Ac/Bu) a expensas de acetato en los ácidos grasos volátiles (VFA) producidos, sin al mismo tiempo disminuir el proceso total digestivo:

30

Se recoge el fluido de la panza de dos novillos sobre una base de rutina regular, alimentandose los dos animales con la misma dieta de forraje más concentrado. El tiempo de muestreo se normaliza en lo posible y el fluido de los dos animales se almacena sobre una base de 50/50. La materia particulada grande se separa por filtración del fluido almacenado a través de cuatro capas de tela de muselina. El filtrado es diluido entonces en la proporción de un volumen de filtrado a tres volúmenes de un fluido de panza artificial (preparado como describe G.L. Bales et al., Journal of Dairy Science, 1976, volumen 59, página 1850, pero omitiendo el ácido acético) y el pH de la mezcla se ajusta a 6,9-7 con una solución acuosa saturada de carbonato sódico. Partes alicuotas (50 ml) de esta mezcla se introducen en matraces cónicos de 100 ml conteniendo 0,5 g de forraje molido y seco y cada matraz se usa para ensayar un compuesto de ensayo a una concentración particular.

El compuesto del ensayo se añade al matraz cónico como una solución en etanol, se inunda el matraz con gas dióxido de carbono, se tapa con un cierre "suba" y se incuba a 39°C durante 15-16 horas. Después de una hora, se inserta una aguja de orificio estrecho a través del cierre para liberar la presión gaseosa y la aguja se extrae 30 minutos antes de finalizar la incubación. La fermentación se detiene luego colocando el matraz en hielo y, después de 15 minutos de enfriamiento, se analiza el gas situado por encima del líquido con respecto al metano por cromatografía de gas. El contenido del matraz se filtra luego a través de un embudo de cristal sintetizado, previamente secado y pesado, el embudo se seca en un horno y, por diferencia, se determina el peso de forraje digerido. (Matraces testigo sin contener forraje, se tratan similar-

mente para determinar el residuo no celulósico). Se analizan tres muestras del filtrado por cromatografía de gas con respecto a VFAs, y por comparación con los previamente determinados, nivel de pre-incubación de VFAs, se determina los VFAs netos (acetato, propionato y butirato) producidos durante la incubación.

Se obtienen los siguientes resultados (monensin, un promotor de crecimiento conocido, que actua por un efecto sobre la panza, se incluye como control positivo, junto con un control negativo en el cual no se emplea compuesto de ensayo):

	% metano en gas total	Ac/Pr	Ac/Bu
Control	8,37	1,90	3,92
ICI 122.378:			
3 $\mu$ g./ml	2,58	1,34	3,52
1 $\mu$ g./ml	3,81	1,26	4,26
0,5 $\mu$ g./ml	4,87	1,29	4,56
0,3 $\mu$ g./ml	5,72	1,36	4,75
0,1 $\mu$ g./ml	7,87	1,63	4,22
Monension			
3 $\mu$ g./ml	4,53	1,54	3,39
1 $\mu$ g./ml	5,62	1,51	3,21
0,5 $\mu$ g./ml	6,75	1,61	4,03
0,3 $\mu$ g./ml	7,53	1,65	4,11
0,1 $\mu$ g./ml	8,35	1,80	4,22

EJEMPLO 3

Se repite la fermentación descrita en el ejemplo 1, el caldo resultante se filtra a través de tierra de diatomeas y el lecho filtrante se lava con 3 l de agua. El filtrado y los lavados se combinan y se extrae a su pH nuestro con acetato de etilo (1 x 9 l y 1 x 7 l). Los extractos de acetato de etilo se combinan, se secan con sulfato sódico y se filtran, y el filtrado se concentra bajo presión reducida para dar un residuo oleoso (8,2 g). El micelio húmedo se homogeniza en metanol y, después de filtrar, la solución metanólica húmeda se concentra bajo presión reducida para dar una solución predominantemente acuosa. Esta solución se extrae dos veces con acetato de etilo (1/3 volumen) y los extractos de acetato de etilo se combinan, se secan con sulfato sódico y se filtra. El filtrado obtenido se concentra bajo presión reducida para dar una goma (1,5 g) que se combina luego con el extracto de acetato de etilo del filtrado de cultivo para dar un peso total de extracto de 9,7 g.

El residuo oleoso (30 g), obtenido como se ha descrito anteriormente a partir de tres de tales fermentaciones de 30 l, se disuelve en el volumen mínimo de éter de petróleo (p.e. 60-80°C) y la solución se aplica a la parte superior de una columna de alúmina neutra (45 cm x 4 1/4 cm, Woelm, 500 g) preparada como una lechada con el mismo disolvente. La columna se eluye primeramente con 2 l de éter de petróleo (p.e. 60-80°C), seguido por 2 l de una mezcla de 10% v/v de acetato de etilo en éter de petróleo (p.e. 60-80°C) que libera cantidades sustanciales de componentes oleosos que se desechan. La mezcla eluyente se cambia entonces a 30% v/v de acetato de etilo en éter de petróleo (p.e. 60-80°C) y se recogen fracciones de 25 ml de

eluyente en un recogedor automático de fracciones. Los Factores B y C se eluyen como una mezcla en tubos 60 a 80, cuyos contenidos se almacenan y concentran para dar un jarabe (730 mg). Este jarabe contiene también pequeñas cantidades de aplasmomicina (Factor A) pero la masa de este compuesto se localiza en los tubos 81-120. Los valores  $R_F$  de los Factores A, B y C tras cromatografía de capa fina sobre placas de gel de sílice de 0,25 mm, 60F-254 de Merck, desarrolladas con 50% v/v de acetato de etilo en éter de petróleo (p.e. 60-80°C) son aproximadamente los siguientes:

	$R_F$
Factor A (aplasomicina)	0,36
Factor B	0,25
Factor C	0,21

Los factores son visualizados como manchas de color marrón después de la pulverización de ácido sulfúrico 3N y calentamiento a 100°C.

El jarabe (60 mg) conteniendo predominantemente Factores B y C, se purifica adicionalmente por cromatografía de capa preparativa sobre sílice (Kieselgel 60 F250 de Merck - marca registrada - 2mm espesor) usando como mezcla eluyente 50% v/v de acetato de etilo en éter de petróleo (p.e. 60-80°C). La banda en  $R_F$  0,25 (aproximadamente) se raspa de la placa y se extracta con acetato de etilo y el disolvente se evapora para dar Factor B como un sólido cristalino blanco (20 mg), el cual se cristaliza en metanol acuoso y se seca bajo vacío, p.f. 260-2°C; I.R. 3360, 1735, 1710, 1285, 1080  $\text{cm}^{-1}$  (Nujol mull). Análisis: Encontrado C = 58,3, H = 7,4. Calculado para  $\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{B NaO}_{15} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; C = 58,7, H = 7,4. Espectro de masa -  $M^+$  = 840,403, calculado para  $\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{B NaO}_{15} = 840,408$ .

El espectro RMN (en  $\text{CDCl}_3$ ) muestra una cresta prominente en  $\delta$  2,1, debido probablemente a un grupo acetilo.

La banda en  $R_F$  0,2 (aproximadamente) se raspa también de la placa y se extracta con acetato de etilo y el disolvente se evapora para dar Factor C como un sólido cristalino blanco (6 mg); p.f.  $>320^\circ\text{C}$ . I.R. 1735, 1715, 1285, 1265  $\text{cm}^{-1}$  (Nujol mull). Espectro de masa  $-M^+$  = 882,418, calculado para  $\text{C}_{44}\text{H}_{64}\text{B NaO}_{16}$  = 822,419.

EJEMPLO 4

Se repite el procedimiento de ensayo del ejemplo 2, comparando aplasmomicina con los Factores B y C. Se obtienen los siguientes resultados, expresados como porcentajes de los valores obtenidos en los controles sin tratar:

	% inhibición de metano	Ac / Pr	Ac / Bu
Aplasmomicina 3ppm	69	-40	-49
Factor B 3ppm	76	-45	-18
Factor C 3ppm	44	-41	+22
Aplasmomicina 1ppm	57	-41	-36
Factor B 1ppm	63	-48	+21
Factor C 1ppm	15	-33	+18

EJEMPLO 5

Los efectos de corta duración de IOI 122,378 y de los Factores B sobre el metabolismo de la panza de la oveja se demuestra como sigue:

Los modelos de fermentación de la panza de un grupo de ovejas, se estabilizan por alimentación a las mismas de una dieta standard de hierba seca (2 x 500 g por día) durante algunos meses. Se usan seis animales de ensayo para cada nivel

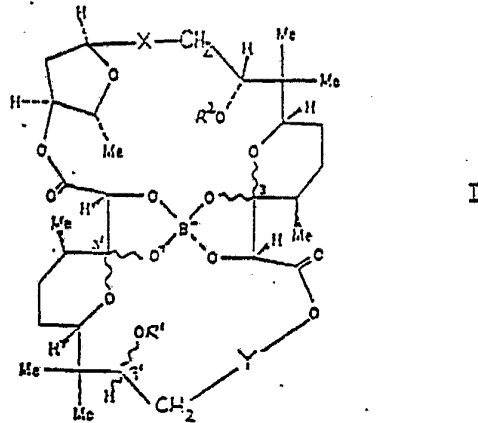
de inclusión de cada compuesto de ensayo. Grupos de animales fueron suministrados también con monensin, un modificador conocido del metabolismo de la panza, como un control positivo, y se usaron doce animales sin tratar como control negativo. Se  
 5 recogen muestras de fluido de panza mediante un tubo al estomago de cada animal 6 horas después del tratamiento y se analizan por cromatografía de gas con respecto a la presencia de acetato, propionato y butirato. Los resultados siguientes fueron los obtenidos:

Tratamiento	Nivel dosis (mg/kg)	Molar % panza V.F.A.		
		Acetato	Propionato	Butirato
Día 4				
Control	0	64,5	24,0	10,2
Monensin	0,5	59,8	27,8	11,3
	0,25	60,5	28,5	9,9
ICI.122.378	0,5	63,4	25,5	9,9
	0,25	63,7	25,1	9,8
Factor B	0,5	65,0	22,4	11,3
	0,25	65,1	22,3	11,3
Día 7				
Control	0	65,6	22,9	10,7
Monensin	0,5	60,2	26,2	12,6
	0,25	61,3	26,1	11,4
ICI.122.378	0,5	62,6	26,6	9,2
	0,25	63,8	24,8	9,9
Factor B	0,5	63,5	25,9	8,9
	0,25	63,5	22,1	11,7

15 Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

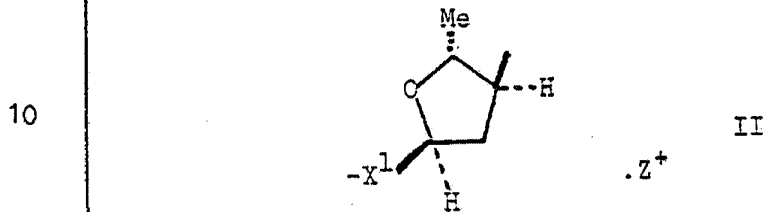
REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento de obtención de compuestos promotores del crecimiento de animales rumiantes, de fórmula:



5 en la que  $R^1$  y  $R^2$  son cada uno un átomo de hidrógeno o un radical acetilo;

y los átomos de carbono 3, 3' y 9' se encuentran todos ellos en la configuración R, X es un radical etileno o trans-vinileno e Y es un radical  $Y^1$  de fórmula:

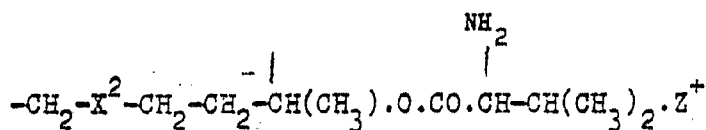
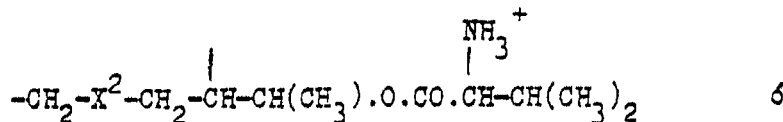


10 en la que  $X^1$  está enlazado al grupo  $CH_2$  y el átomo de carbono del anillo está enlazado al átomo de oxígeno, y en donde  $X^1$  es un radical etileno o trans-vinileno, y  $Z^+$  es un ión sodio, potasio, litio, cesio o amonio, o un ión de fórmula  $R^3R^4R^5R^6N^+$

15 en donde cada radical  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  y  $R^6$  es hidrógeno o alquilo con 1 a 6 átomos de carbono;

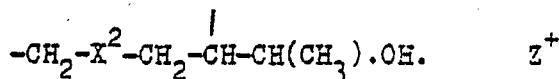
o los átomos de carbono 3, 3' y 9' se encuentran todos ellos

en la configuración S, X es un radical etileno e Y es un radical Y<sup>2</sup> de fórmula:



5 en donde el grupo CH<sub>2</sub> está enlazado al grupo CH<sub>2</sub> mostrado en la fórmula I, y el grupo CH está enlazado al átomo de oxígeno, y en donde X<sup>2</sup> es un radical etileno o cis-vinileno; o los átomos de carbono 3, 3' y 9' se encuentran todos ellos en la configuración S, X es un radical etileno e Y es un radical Y<sup>3</sup> de fórmula:

10



en donde X<sup>2</sup> y Z<sup>+</sup> se definen como anteriormente caracterizado porque para preparar un compuesto de fórmula I en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son cada uno un átomo de hidrógeno o un radical acetilo, X es trans-vinileno e Y es un radical Y<sup>1</sup> en donde X<sup>1</sup> es trans-vinileno y Z<sup>+</sup> es un ion sodio, se cultiva una cepa o mutante de Streptomyces griseus productor de aplasmomicina en un medio nutriente acuoso, que contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y boro y una sal sódica bajo condiciones aeróbicas, a

15

20 una temperatura de 10 a 37°C; se filtra el cultivo; y se aísla el producto del filtrado por medios convencionales.

5 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la cepa o mutante de S.griseus productor de aplasmomicina es la depositada en National Collection of Industrial Bacteria. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Torry Research Station. 135 Abbey Road, Aberdeen, AB9 8DG, Escocia, y que tiene la descripción anteriormente indicada en la memoria descriptiva.

10 3.- Procedimiento para preparar un compuesto de fórmula I en la que  $R^1$  y  $R^2$  son cada uno un átomo de hidrógeno o un radical acetilo y:

15 (a) los átomos de carbono 3, 3' y 9' se encuentran todos ellos en la configuración R, Y es un radical  $Y^1$ , uno cualquiera de X y  $X^1$  es un radical etileno y el otro es un radical trans-vinileno, o ambos X y  $X^1$  son radicales etileno, y  $Z^+$  se define como anteriormente; ó

20 (b) los átomos de carbono 3, 3' y 9' se encuentran todos ellos en la configuración R, X es un radical trans-vinileno, e Y es un radical  $Y^1$  en donde  $X^1$  es un radical trans-vinileno y  $Z^+$  es un ion potasio, litio, cesio o amonio, ó un ion de fórmula  $R^3R^4R^5R^6N^+$  como anteriormente se ha definido; ó

(c) los átomos de carbono 3, 3' y 9' se encuentran todos ellos en la configuración S, X es un radical etileno e Y es un radical  $Y^2$  en donde  $X^2$  es un radical etileno; ó

25 (d) los átomos de carbono 3, 3' y 9' se encuentran todos ellos en la configuración S, X es un radical etileno e Y es un radical  $Y^3$  en donde  $X^2$  se define como anteriormente y  $A^+$  es un ion potasio, litio, cesio o amonio o un ion de fórmula  $R^3R^4R^5R^6N^+$  como anteriormente se ha definido; caracterizado porque

- 5 (i) para preparar los nuevos compuestos definidos en (a) anteriormente, la hidrogenación selectiva o no selectiva de un compuesto correspondiente de fórmula I en donde X y X<sup>1</sup> son cada uno un radical trans-vinileno, sobre un catalizador de platino o paladio; ó
- 10 (ii) para preparar los nuevos compuestos definidos en (b) anteriormente, la fermentación de una cepa de S.griseus productora de aplasmomicina o productora de ICI 122.378, como anteriormente se ha definido, en presencia de una sal de potasio, litio, cesio, amonio o de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> N<sup>+</sup> en un medio nutriente acuoso; o
- 15 (iii) para preparar los nuevos compuestos definidos en (c) anteriormente, la hidrogenación, sobre un catalizador de platino o paladio, de un compuesto correspondiente de fórmula I en donde X es un radical etileno e Y es un radical Y<sup>2</sup> en donde X<sup>2</sup> es un radical cis-vinileno; o
- 20 (iv) para prepara los nuevos compuestos definidos en (d) anteriormente, la reacción de un compuesto de fórmula I en donde X es un radical etileno e Y es un radical Y<sup>2</sup> con hidróxido de potasio, litio o cesio o bien carbonato de potasio, litio o cesio.

4.- Procedimiento de obtención de compuestos promotores del crecimiento de animales rumiantes, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

25 Esta Memoria consta de 26 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

- 9 ENE. 1979

IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED.

EL SEÑOR DON J. GARCÍA  
S. C. España 1, Sanja D...