DESCRIÇÃO

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 85.921

REQUERENTE: PFIZER LIMITED., inglesa, industrial, em Ramsgate Road, Sandwich, Kent - REINO UNIDO

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM NOVO ANTIBIOTICO GLICOPEPTIDICO"

INVENTORES: HOLDOM KELVIN SCOTT; RUDDOCK JOHN CORNISH TONE JUNSUKE ; MAEDA HIROSHI

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

Reino Unido, em 16 de Outubro de 1986, sob o No.8624806

75 921

MEMORIA DESCRITIVA

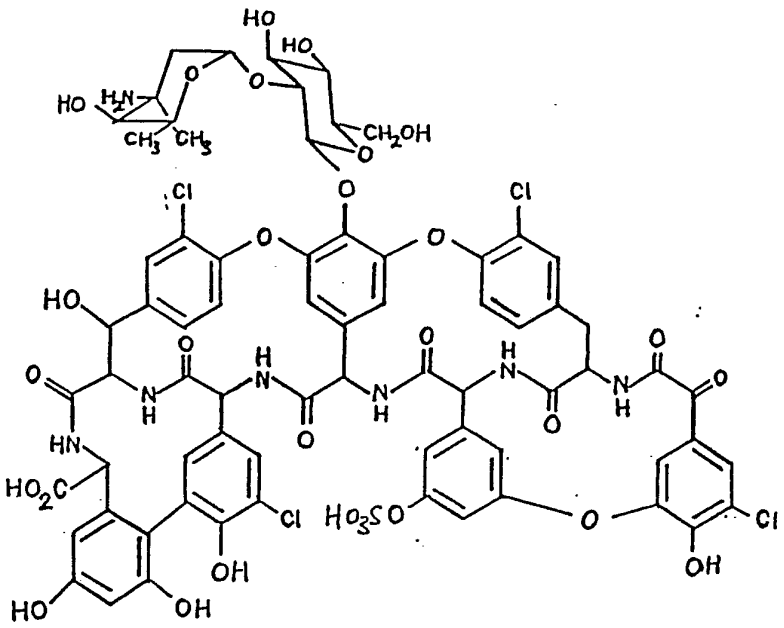
Resumo

A invenção refere-se a um processo para a preparação de um novo antibiótico glicopeptídico UK-68, 598 que tem a fórmula:

==========

PFIZER LIMITED

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM NOVO ANTIBIOTICO GLICOPEPTÍDICO"



o qual pode ser preparado por propagação aeróbica submersa em meios nutritivos aquosos de Actinoplanes sp. ATCC 53533.

O antibiótico e os seus catiónicos são activos contra diversos microorganismos e são eficazes no controle de coccidiose, entrite, disentria de suínos e teileriose, e também eficazes para promover crescimento e/ou melhorar a eficiência da utilização de alimentos em aves domésticas, suínos e ruminantes.

Antecedentes da Invenção

A presente invenção diz respeito a um novo elemento do grupo glicopeptídico de antibióticos, classe de compostos caracterizados biologicamente pela sua acção antibacteriana Gram-positiva exercida pela inibição de biossíntese de parede de célula bacteriana. Esta família de antibióticos inclui agentes conhecidos, por exemplo avoparcina; actaplanina; teicoplanina; complexo A41030 e as aridicinas. O assunto foi examinado por Williams e Barna. "Estrutura e modo de acção de glicopeptídeos antibióticos do grupo vancomicina". Annual Rev. Microbiol., 38, 339, 1984.

Na busca de novos antibióticos, tenta-se sempre que possivel a modificação estrutural de antibióticos conhecidos. Esta via está limitada, no entanto, a modificações que retêm a actividade desejada. Muitos antibióticos, incluindo os glicopeptídeos, têm estruturas tão complexas que pode ser dificil fazer, por meios químicos, mesmo pequenas modificações. A descoberta de novos antibióticos produzidos por processos de fermentação continua a ter, portanto, grande importância mesmo em casos em que o antibiótico, uma vez identificado, é muito similar a um antibiótico conhecido anteriormente.

Os glicopeptídeos antibióticos mencionados acima são activos contra bactérias Gram-positivas. Têm sido utilizados, portanto, com graus de êxito diversos para administração a aves domésticas e outros animais de criação incluindo os ruminantes e porcos, para controlar infecção ou promover crescimento ou produção de leite.

Entre diversos estados que podem ser tratados com estes agentes está a entrite, uma doença que pode causar grandes perdas económicas a produtores de gado. A enterite ataca frangos, porcos, gado vacum e ovinos e é atribuida principalmente a bactérias anaeróbicas, particularmente Clostri-

dium perfringens, e víros. A enteroxemia em ruminantes, um exemplo da qual é a "doença do excesso de comida" nos ovinos, é um estado causado por infecção devida a C. perfringens.

A melhoria de resultados (maior velocidade de crescimento e/ou maior eficiência de utilização dos alimentos) em ruminantes como gado vacum, e em animais monogástricos como porcos, é outro objectivo economicamente desejável da ciência veterinária. Tem interesse particular a melhoria de resultados obtida pelo aumento da eficiência da utilização dos alimentos. O mecanismo para a utilização da maior parte nutritiva de alimentos para ruminantes é conhecido. Microrganismos do rúmem do animal degradam hidratos de carbono para produzir monossacáridos, e, em seguida, transformar estes monossacáridos em compostos piruvatos são metabolizados por processos microbiológicos para formar acetatos, butiratos ou propionatos, denominados colectivamente ácidos gordos voláteis. Embora se utilizem acetatos e butiratos, os propionatos são utilizados com maior eficiência. Além disso, quando se dispõe de propionato em quantidade pequena de mais, os animais podem sofrer de cetose. Um composto benéfico, portanto, estimula os animais a produzir uma proporção maior de propionatos a partir de hidratos de carbono, aumentando por este meio a eficiência da utilização de hidrato de e diminuindo ao mesmo tempo a incidência de cetose.

Descrição Pormenorizada da Invenção

A presente invenção refere-se a um novo glicopeptídeo ácido antibiótico, designado por UK-68,597, produzido pela propagação aeróbica submersa em meios nutritivos aquosos de um microrganismo isolado a partir de uma amostra de solo proveniente de Sam Diego, Califórnia, EUA. O antibiótico é activo contra vários microrganismos e é eficaz na promoção de crescimento e no aumento da eficiência da utilização dos alimentos em aves domésticas, suínos e ruminantes.

O microrganismo é designado na presente por Actinoplanes sp, ATCC 53533. Foi identificado como uma espécie de Actinoplanes devido às suas hifas estreitas, micélio substrato laranja-amarelado a laranja e composições de aminoácido e açucar da célula completa.

Uma cultura deste microrganismo, designada na presente por N693-3, foi plantada a partir de um corte em caldo de cultura ATCC Nº. 172 e cultivada durante quatro dias a 28ºC num sacudidor. Seguidamente foi centrifugada durante 20 minutos, lavada três vezes com água destilada esterilizada e plantada em meios correntemente utilizados para identificação de elementos dos Actinomicetales conforme descrito adiante. A cultura foi incubada à temperatura de 28ºC e os resultados foram lidos em momentos diversos, mas a sua maior parte foi correntemente lida aos 14 dias. As cores descritas em terminologia comum mas determinaram-se cores exactas por meio de comparação com rodelas coloridas do Manual da Harmonia das Cores, quarta edição. Os métodos das análises de aminoácido e açucar da célula completa são os descritos por Becker, B. et al, Appl. Microbiol. 12,421-423, 1964; e por Lechevalier, M. P., J. Lab. Clin. Med., 71,934-944, 1968.

Os meios de identificação utilizados para a caracterização da cultura e as referências para a sua composição são os seguintes:

1. Caldo de Extrato Triptona-Fermento - (meio ISP nº.1, Difco)

2. Agar de Extracto Fermento-Extracto Malte - (meio ISP nº. 2, Difco).

3. Agar de Farinha de Aveia - (meio ISP nº.3, Difco).

4. Agar de Sais Inorgânicos-Amido - (meio ISP nº.4, Difco).

5. Agar de Glicerol-Asparagina - (meio ISP nº.5, Difco).

6. Agar Ferro Extrato Peptona-Fermento - (meio ISP nº.6, Difco).

7. Agar Czapek-Sacarose - S.A. Waksman, The Actinomycetes, Vol. 2, meio nº. 1, p. 328, 1961.

8. Agar Glucose-Asparagina - Ibid, meio nº. 2, p. 328.

9. Agar de Bennett - Ibid, meio nº. 30, p. 331.

10. Agar de Emerson - Ibid, meio nº. 28, p. 331.

11. Agar Nutritivo - Ibid, meio nº. 14, p. 330

12. Agar de Extracto Glucose-Fermento - Ibid, meio nº. 29, p. 331.

13. Agar de Peptona-Czapek - J.N. Couch, J. Elisha Mitchell Soc., 79,53-70, 1963.

14. Agar de Hickey e Tresner - R.J. Hickey e H.D. Tresner, J. Bacteriol., 64,891-892, 1952.

15. Agar Tirosina de Gordon e Smith - R.E. Gordon e M.M. Smith, J. Bact., 69,147-150, 1955.

16. Agar de Caseína - Ibid.

17. Agar de Malato de Cálcio - S.A. Waksman, Bact. Rev., 21,1-29, 1957.

18. Agar de Gelatina - R.E. Gordon e J.M. Mihm, J. Bact., 73,15-27, 1957.

19. Agar de Amido - Ibid.

20. Agar de Nitrato Orgânico - Ibid.

21. Agar de Cenoura e Batata - M.P. Lechevalier, J. Lab. and Clin. Med. 71,934,944, 1968, mas utilizar apenas 30 g de batatas, 2,5 g de cenouras e 20 g de ágar.

22. Agar de Agua Corrente a 2%.

23. Caldo de Nitrato de Dextrose - S.A. Waksman, The Actinomycetes, Vol. 2, meio nº. 1, p. 328, 1961, com 3 g de dextrose a substituir 30 g sacarose e sem ágar.

24. Utilização de celulose
    a) H.L. Jensen, Proc. Linn, Soc. N.S.W., 55,231-248, 1930.
    b) M. Levine e H. W. Schoenlein, Compilação de Meios de Cultura, meio nº. 2511, 1930.

25. Leite Desnatado - Difco.

26. Hidratos de Carbono - G.M. Luedemann e B.C. Brodsky, Antimicrob. Agents Chemother., 1964,47, 1965, meio ISP nº.9 Difco.

27. Gama de Temperaturas - Manual de Meios ATCC, meio ATCC 172 1ª edição, p. 10, 1984.

As observações de crescimento e aspecto do organismo foram as seguintes:

Agar de Extracto de Fermento-Extracto de Malte - Crescimento bom, laranja a laranja amarelado (5ia, 51a, 4ga), rugoso, elevado, nenhum micélio aéreo; reverso igual à superfície; nenhum pigmento solúvel.

Agar de Farinha de Aveia - Crescimento moderado a bom, creme mas laranja amarelado pálido em direcção à borda, moderadamente elevado, liso, nenhum micélio aéreo; reverso laranja amarelado palido (3ca, 3ea); nenhum pigmento solúvel.

Agar de Sais Inorgânicos-Amido - Crescimento moderado, laranja amarelado (4ea, 4ga), liso, um puoco elevado, nenhum micélio aéreo; reverso igual à superfície; nenhum pigmento solúvel.

Agar de Glicerol-Asparagina - Crescimento bom, laranja a laranja escuro (41a, 51a), enrugado, elevado, nenhum micélio aéreo; reverso igual à superfície; nenhum pigmento solúvel.

Agar de Czapek-Sacarose - Crescimento moderado, laranja amarelado pálido (3ca), um pouco elevado, nenhum micélio aéreo; reverso laranja amarelado pálido (3ca, 3ea); nenhum pigmento solúvel.

Agar de Glucose-Asparagina - Crescimento moderado a bom, laranja (4ga, 4ia), liso mas pode ser enrugado em direcção à borda, moderadamente elevado, nenhum micélio aéreo; reverso laranja (4ia, 41a); nenhum pigmento solúvel.

Agar de Bennet - Crescimento bom, laranja amarelado (4ia, 4pa), enrugado, elevado, nenhum micélio aéreo; reverso laranja amarelado (41a, 4pa), nenhum pigmento solúvel.

Agar de Emerson - Crescimento bom,laranja avermelhado (6ia, 6,5ga), enrugado, elevado, nenhum micélio aéreo; reverso igual à superfície; pigmento solúvel castanho amarelado (41c).

Agar Nutritivo - Crescimento fraco a moderado, laranja avermelhado (5ea,55ga, 6ga), liso mas enrugado em direcção ao fim de faixa, delgado mas elevado em direcção ao fim de faixa, nenhum micélio aéreo; reverso igual à superfície; nenhum pigmento solúvel.

Agar de Extracto Glucose-Fermento - Crescimento excelente, laranja (41a, 51a), enrugado, muito elevado, nenhum micélio aereo; reverso igual à superfície; pigmento solúvel castanho amarelado (31c).

Agar de Peptona-Czapek - Crescimento escasso, laranja amarelado (4ia), granular, elevado, nenhum micélio aéreo; reverso igual à superfície; nenhum pigmento solúvel.

Agar de Hickey e Tresner - Crescimento bom, amarelado a laranja amarelado (3ea, 3ia, 4ia), enrugado, elevado, nenhum micélio aéreo; reverso igual à superfície; nenhum pigmento solúvel.

Agar Tirosina de Gordon e Smith - Crescimento moderado, avermelhado escuro (61e, 6,51e), liso mas pode ser enrugado no fim de faixa, delgado a um pouco elevado, nenhum micélio aéreo; reverso castanho a castanho avermelhado (51e, 61a); pigmento solúvel castanho escuro (5ng).

Agar de Caseína - Crescimento moderado a bom, laranja vivo (5na, 5pa), enrugado, moderadamente elevado, nenhum micélio aéreo; reverso igual à superfície; pigmento solúvel amarelado (21c).

Agar de Malato de Cálcio - Crescimento fraco a moderado, laranja amarelado pálido (3ea, 4ea), liso, delgado, nenhum micélio aéreo; reverso igual à superfície; nenhum pigmento solúvel.

Agar de Gelatina - Crescimento moderado a bom, laranja (5ga, 5ia), enrugado, moderadamente elevado , nenhum micélio aéreo; reverso igual à superfície; nenhum pigmento solúvel.

Agar de Amido - Crescimento bom, laránja (5ia), enrugado, elevado , nenhum micélio aéreo; reverso laranja (5ia, 6ga); nenhum pigmento solúvel.

Agar de Cenoura e Batata - Crescimento moderado, laranja-amarelado (3ea, 3ga), liso, delgado, nenhum micélio aéreo; reverso igual à superfície; nenhum pigmento solúvel.

Agar de ägua Corrente - Crescimento fraco a moderado, creme (2ca), liso, delgado, nenhum micélio aéreo; reverso incolor a creme (2ca); nenhum pigmento solúvel.

Propriedades Morfológicas - Hifas vegetativas estreitas, rectas ou onduladas, ramificadas, diâmetro 0,4-1,0 um, não se produziram nenhuns esporos ou esporângios depois de decorridas quatro semanas de incubação nos meios utilizados; decorridas sete semanas de incubação a 21ºC ou 28ºC em ágar de farinha de aveia, ágar de glicerol-asparagina, ágar de Czapek-sacarose, ágar de extractos de glucose-fermento ou ágar de Hickey e Tresner, não se produziram esporos ou esporângios.

Propriedades Bioquímicas - Melanina não produzida em caldo de extracto triptona-fermento; sulfureto de hidrogénio produzido em ágar de extracto de peptona-fermento; gelatina liquefeita; amido hidrolisado; nitrato reduzido para nitrito em caldo de nitrato orgânico e caldo de nitrato de dextrose; crescimento bom mas nenhuma desintegração em ambos os caldos de celulose; coagulação em leite; digestão de caseína positiva; digestão de malato de cálcio negativa; digestão de tirosina negativa. Utilização de hidrato de carbono; glucose, arabinose, frutose, inositol, manitol, rafinose, ramnose, sacarose, xilose, celobiose, dulcitol, galactose, glicerol, lactose, manose, melezitose, melibiose, ribose, salicina, amido solúvel, sorbitol e trehalose utilizados, adonitol e sorbose não utilizados.

Relações de Temperatura:

21ºC	28ºC	37ºC	45ºC
Crescimento Excelente	Crescimento Excelente	Crescimento Bom a Excelente	Nenhum Crescimento

Análise de Parede de Célula - Os hidrolisados de célula completa comtinham ácido 3-hidroxidiaminopimélico, xilose, arabinose, glucose, manose e ribose.

A cultura N693-3 é caracterizada pelo micélio substrato laranja-amarelado a laranja, a falta de esporos ou esporângios, e a ausência de pigmentos solúveis na maior parte dos meios utilizados. As tentativas feitas para induzir a produção de esporo ou esporângio falharam. As reacções negativas incluem produção de melanina, desintegração de celulose, digestão de malato de cálcio ou tirosina, utilização de adonitol e sorbase, e crescimento a 45ºC. As reacções que se seguem são positivas: liquefacção de gelatina, hidrólise de amido, redução de nitrato, crescimento em celulose, coagulação e clarificação em leite, digestão de caseína, utilização de todos os açúcares utilizados, salvo adonitol e sorbose; crescimento a 21ºC, 28ºC e 37ºC. A presença de ácido 3-hidroxidiaminopimélico, xilose, arabinose, manose e ribose indica que a cultura pertence ao Tipo II de parede de célula.

Visto que a cultura em estudo não produziu esporângios, e dado que a apreciação do género Actinoplanes depende das dimensões e formas dos esporângios, a sua identificação ao nível de espécie é impossível, e, por conseguinte, a cultura N693-3 é comsiderada uma espeĉie do género Actinoplanes e denominada Actinoplanes sp. Foi depositada na Colecção Americana de Culturas Tipo, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, E:U.A., de acordo com os termos do Tratado de Budapeste de 3 de Setembro de 1986, com o número de entrada ATCC 53533.

A cultura e isolamento de Antibiótico UK-68.597 podem ser efectuados em condições análogas às geralmente utilizadas para produzir antibióticos por fermentação. A cultura efectua-se preferivelmente em meios nutritivos aquosos em condições aeróbicas submersas, com agitação, a

uma temperatura de 24º a 36ºC. Os meios nutritivos utilizáveis para a cultura incluem uma fonte de carbono assimilável, por exemplo açúcares, amidos e glicerol; uma fonte de azoto orgânico, por exemplo caseína, digesto enzimático de caseína, farinha de soja, farinha de semente de algodão, farinha de amendoim, glútem de trigo, farinha de carne e farinha de peixe. Uma fonte de substâncias de crescimento, por exemplo grãos solúveis, farinha de peixe, farinha de semente de algodão, e extracto de fermento assim como sais minerais, por exemplo cloreto de sódio e carbonato de cálcio e vestígios de elementos, por exemplo ferro, magnésio, cobre, zinco, cobalto e manganés, pode também ser utilizada com resultados vantajosos. Se houver formação de espuma excessiva durante a fermentação podem juntar-se agentes antiespuma, por exemplo polipropileno glicóis ou silicones ao meio de fermentação. O arejamento do meio em tanques para crescimento submerso é mantido preferivelmente com o débito de cerca de 0,5 a 2 volumes de ar livre esterilizado por volume de caldo de fermentação por minuto, forçado para o interior do caldo de cultura por meio de um aspersor. Pode manter-se agitação por meio de agitadores conhecidos em geral pelos técnicos da fermentação. A velocidade da agitação depende do tipo de agitador utilizado. Um balão sacudidor é agitado em geral a 150 a 200 ciclos por minuto, ao passo que um fermentador é mantido em geral a 300 a 1700 revoluções por minuto. É claro que se devem manter condições assépticas durante a transferência do organismo e durante todo o seu crescimento.

Pode obter-se inóculo para a preparação dos antibióticos de acordo com a presente invenção, por meio da utilização de crescimento a partir de um corte da cultura ou de garrafas Roux inoculadas com a cultura:Um meio sólido apropriado para crescimento inicial do organismo em cortes e em garrafas Roux é o meio ATCC nº. 172. A cultura pode ser utilizada para inocular balões sacudidores ou tanques de inóculo, ou os tanques de inóculo podem ser semeados a partir dos balões sacudidores. A cultura em frascos sacudidos a-

tingirá em geral o máximo ao fim de 4 ou 5 dias, ao passo que inóculo em tanques de inóculo submerso estarão no período mais favoravel ao fim de 3 a 6 dias.

O andamento da produção de antibiótico durante a fermentação e a bioactividade da cultura de fermentação e a bioactividade da cultura de fermentação podem ser observados por meio de experiência biológica da cultura com o emprego de uma estirpe sensível de Staphylococcus aureus ou Bacillus subtilis. A estirpe B. Subtilis ATCC 6633 é apropriada para este fim. Emprega-se técnica de experiência de placa normal, na qual a zona de inibição que rodeia um disco de papel de filtro saturado com a cultura é utilizada como medida de potência antibiótica. Além disso,a cromatografia de camada delgada que emprega gel de sílica é um instrumento útil para a detecção dos antibióticos produzidos em meios de fermentação e para a análise da composição de materiais impuros e purificados extraídos das culturas de fermentação. Os cromatogramas são revelados com acetonitrilo, água, hidróxido de amónio (3:1.7), e a placa revelada é revestida com ágar semeado com S. aureus ou B. subtilis e incubada a 37ºC durante 16 horas para tornar visíveis os antibióticos.

O antibiótico UK-68,597 produzido por fermentação de Actinoplanes sp, ATCC 53533 pode ser separado por meio de ajustamento do pH de toda a cultura para pH 10 e filtração da cultura para retirar micélio. O antibiótico pode ser adicionalmente purificado por sucessão de adsorções em adsorventes apropriados, por exemplo resinas permutadoras de iões, suportes inorgânicos hidrófobos modificados quimicamente como os utilizados em cromatografia líquida de fase inversa com grande eficácia, ou polímeros com grande porosidade, eluindo o antibiótico em cada caso com um dissolvente apropriado.

O composto antibiótico de acordo com a presente invenção é ácido, e formará sais catiónicos por reacção com agentes básicos. Todos esses sais estão abrangidos

no âmbito da invenção.

O antibiótico UK-68.597 pode ser caracterizado com base nas seguintes propriedades fisioquími - cas.

A) Espectro de absorção ultraviole - ta. O composto apresenta os seguintes máximos de absorção:

Dissolvente	λ máx (nm)
a) metanol	238, 280, 370
b) metanol, HCl 0,1 M (9:1)	238, 286
c) metanol, NaOH 0,1 M (9:1)	264, 300, 358

B) Espectro de absorção infraverme - lha. O composto apresenta os seguintes máximos de absorção (cm^{-1}); 3700-3100; 1660; 1595; 1500; 1230; 1140; 1055; 1015; 990; 755.

C) Rotação óptica $/\alpha/_D^{250} = -25,6º$ (c = 0,1, DMSO)

D) Tempo de retenção (Rt) de 12,4 minutos, quando analisado por CLPE de fase inversa nas seguintes condições:

Coluna : C-18 Micro-Bondapack, 3,9 mm (i.d.) × 150 mm (waters)

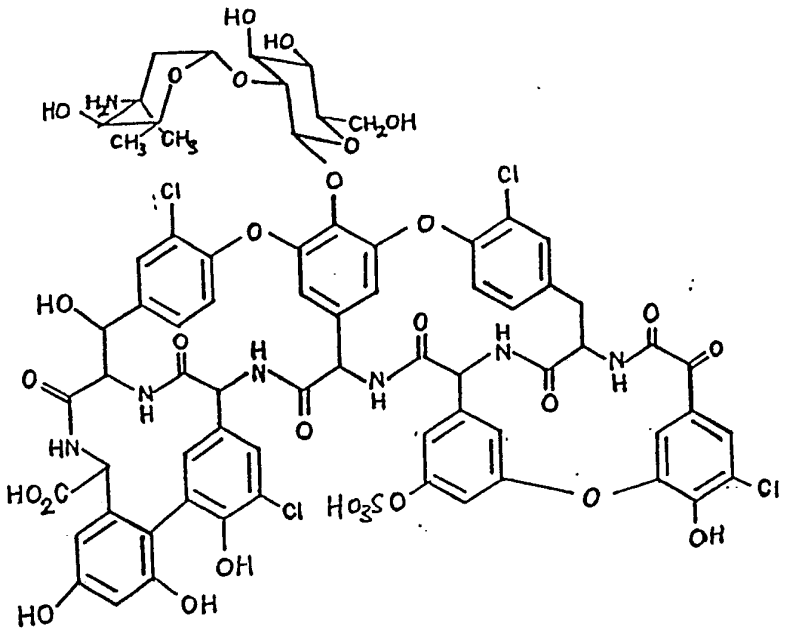
Eluente : CH_3CN 10%, formato de amónio aquoso 0,1M 90% ajustado para pH 7,4

Caudal : 2 ml/min

Detecção : U.V. a 225 nm

E) Peso molecular deduzido de um espectro de massa de bombardeamento atómico rápido que apresenta o pico M+ em m/e 1651.

Com base em espectroscopia de ressonância magnética nuclear em combinação com espectrometria de massa, foi atribuida ao UK-68.597 a seguinte estrutura:



O antibiótico UK-68.597 manifesta ação inibitória contra o crescimento de vários microrganismos Gram-positivos. No Quadro 1, abaixo, estão resumidos os resultados de experiências in vitro. Para esta experiência, cada organismo é inoculado numa série de tubos de ensaio que contêm meio nutritivo e diversas concentrações de Antibiótico UK-68.597 para determinar a concentração mínima do composto em mcg/ml que inibe o crescimento do organismo durante um período de 24 horas (MIC).

QUADRO I

ACTIVIDADE ANTIBACTERIANA

Organismo	Estirpe Nº.	MIC, mcg/ml Antibiótico UK-68.597
Staphylococcus aureus	01A106	12,5
	01A539	12,5
	01A540	12,5
Actinomyces pyogenes	14D011	< 0,2
Pasteurella multocida	59A006	>100
Clostridium perfringens	10A009	< 0,2
Bacteroides fragilis	78C024	>100
Fusobacterium necrophorum	84C004	>100
Treponema hyodysenteriae	94A007	>100

Contra as bactérias gram-negativas como Escherischia coli, e Pseudomonas aeruginosa, os valores MIC foram > 100 em cada caso.

O valor de alimentos para animais tem sido determinado em geral directamente, alimentado o animal. A especificação de Patente Britânica Nº. 1.197.826 descreve pormenorizadamente uma técnica de rúmen in vitro por meio da qual as alterações produzidas em alimentos provocados por microrganismos são medidas mais facilmente e com grande rigor na avaliação de alimentos para animais. Esta técnica inclui a utilização de um aparelho no qual os processos digestivos dos animais são efectuados e estudados in vitro. Os alimentos para animais, inóculo rúmen e diversos promotores de crescimento são introduzidos e retirados de uma unidade de laboratório em condições cuidadosamente controladas, e as alterações produzidas são estudadas crítica e progressivamente durante o consumo do alimento pelos microrganismos. Um aumento do conteúdo de ácido propiónico do fluido do rúmens indica que uma resposta desejável quanto ao resultado ruminante global foi proporcionada pelo promotor de crescimento na composição alimentar. A variação do conteúdo de ácido propiónico é expressa em percentagem do conteúdo de ácido propiónico encontrado no fluido de rúmen de controlo. Estudos de alimentação in vivo de longo prazo são utilizados para mostrar uma correlação fidedigna entre aumento de ácido propiónico no fluido de rúmen e maior resultado no animal.

Colhe-se fluido de rúmen de uma vaca fistulada que é alimentada com uma ração de engorda comercial mais feno. O fluido de rúmen é imediatamente filtrado através de pano para queijo, e adiciona-se 10 ml a um frasco cónico de 50 ml que contém 400 mg de substrato normal (68% amido de milho + 17% celulose + 15% farinha de soja extraída), 10 ml de um tampão pH 6,8 e o composto em experiência. Os frascos são gaseados com azoto livre de oxigénio durante aproximadamente

dois minutos, e incubados num banho de água sacudido a 39ºC, durante cerca de 16 horas. Todas as experiências são feitas em triplicado.

Depois de incubação, misturam-se 5 ml da amostra com 1 ml de ácido metafosfórico a 25%. Passados 10 minutos, adicionam-se 0,25 ml de ácido fórmico e a mistura é centrifugada a 1500 rpm durante 10 minutos. As amostras são depois analisadas por cromatografia líquido-gás pelo método de D. W. Kellog, J. Dairy Science, 52, 1690, 1968. Os máximos para ácidos acético, propiónico e butírico são determinados para amostras provenientes de frascos não tratados e tratados.

Quando exprimentado por este processo in vitro, o Antibiótico UK-68.597 ao nível de 10 microgramas por mililitro provocou um aumento de cerca de 25% na produção de ácido propiónico em relação ao produzido na solução de contrlo sem Antibiótico UK-68.597 adicionado. Em comparação, o composto salinomicina à venda no mercado (um poliéter antibiótico) a 10 mg/ml produziu um aumento de cerca de 46% de ácido propiónico em relação ao controlo.

Estes dados mostram que o Antibiótico UK-68.597 aumentará a utilização de alimentos por ruminantes como gado vacum e ovinos. Os compostos terão também um efeito análogo em animais monogástricos como suínos e aves domésticas.

Em particular, comforme indicado no Quadro 2, o Antibiótico UK-68.597 é conveniente para aumentar o ganho de peso e a utilização de alimento em aves domésticas.

O composto foi adicionado ao alimento que é dado a pintos de criação com quatro dias de idade que se encontram em filas numa base de acesso livre. Decorridos dez dias, as aves são pesadas e o ganho de peso vivo é comparado com um grupo de controlo não tratado para dar uma melho-

ria percentual de ganho de peso vivo. A quantidade de alimento consumida é dividida pelo peso vivo dos animais do grupo quando se completa a experiência, para se obter uma taxa de transformação (que dá uma medida da quantidade de alimento necessária para produzir 1 aumento de 1 Kg do peso corporal), e esta é também comparada com o grupo de controlo e o aumento da taxa de transformação de alimento é calculado em percentagem. Os resultados mostram uma melhoria significativa tanto no ganho de peso vivo como na eficiência de transformação do alimento quando se junta Antibiótico UK-68.597 a alimentos num nível de 10 ppm:

QUADRO 2

AUMENTO DO EFEITO DE ACTIVIDADE EM AVES DOMESTICAS

Ppm	Ganho de peso vivo (melhoria %)	Taxa de transformação de alimento (melhoria %)
10	4,3	2,7

O Antibiótico UK-68.597 pode ser incorporado em composições alimentares na forma do ácido livre ou na forma de sal. Podem empregar-se formas impuras alternativas de Antibiótico UK-68.597 ou cultura de fermentação seca que contém os antibióticos, por meio de incorporação em composições alimentares, para se obterem as concentrações de potência desejadas de antibiótico.

A invenção é descrita de maneira mais completa pelos Exemplos que se seguem.

EXEMPLO 1

1. Preparação de Inóculo

Preparou-se um meio aquoso esterilizado que tem a seguinte composição.

Ingrediente	Gramas/litro
Glucose	1
Amido	24
Peptona	5
Extracto de fermento	5
Extracto de carne	3
Carbonato de cálcio	4

Distribui-se 1 litro de meio por frascos cónicos de 2,8 litros e esteriliza-se a 120ºC e 1,05 kg/cm^2 (15 p.s.i.) durante 30 minutos. Depois de arrefecimento, o meio é inoculado com uma suspensão de célula vegetativa proveniente de um corte de cultura de Actinoplanes sp ATCC 53533.

Os frascos são sacudidos a 28ºC num sacudidor rotativo quer tem uma deslocação de 4 a 7 cm e 150 a 200 ciclos por minuto durante três a cinco dias.

2. Fermentação e isolamento de Antibiótico UK-68.597

Utilizaram-se 50 ml do meio inóculo descrito no Exemplo 1 para inocular cada um de nove recipientes de fermentação de cinco litros que contêm 2,5 litros de

meio esterilizado com a composição que se segue, à qual foi adicionado 1 ml de agente antiespuma polipropileno glicol:

Ingrediente	Gramas/litro
Cerelose	10,0
Amido de milho	10,0
Farinha de soja	10,0
Soluveis de destilaria	5,0
Cloreto de sódio	5,0
Carbonato de cálcio	1,0
Cloreto de cobalto	0,002
Agua para 1 litro	
pH 6,9-7,0	

Efectuou-se fermentação a 28ºC com agitação a 1500 revoluções por minuto e arejamento a um volume de ar por volume de cultura por minuto até se observar actividade substancial (com base em experiência de disco antibiótico dontra B.subtilis ATCC 6633), geralmente 4 a 6 dias.A bioactividade da cultura, ede corrente de recuperação subsequentes, foi acompanhada com oeemprego de uma estirpe sensível de Bacillus subtilis ATCC 6633 ou Staphylococcus aureus ATCC 6538. O componente antibiótico da cultura e correntes de recuperação subsequentes, foi acompanhada com o emprego de uma etirpe sensível de Bacillus subtilis ATCC 6633 ou Staphylococcus aureus ATCC 6538. O componente antibiótico da cultura e correntes de recuperação foram detectados depoius de separação cromatográfica com utilização de placas de sílica de gel reveladas com acetonitrilo, água, hidróxido de amónio (3:1:0,7). As placas foram tornadas visiveis com luz UV a 254 nm e em seguida revestidas com ágar, semeado com S. aureus ou B. subtilis, ao qual se tinham adicionado 1,0 ml de uma solução a 1% de cloreto de

2,3,5,-trifenil-2H-tetrazólio, e incubadas a 37ºC durante 16 horas para se observar o antibiótico na forma de uma área branca contra um fundo cor de rosa.

No final da fase de produção de fermentação, a cultura proveniente de todos os fermentadores foi ajustada para pH 10 e filtrada para separar micélio. O antibiótico UK-68.597 foi adsorvido sobre uma coluna de afinidade que compreende um ligando D-alanina-D-alanina imobilizado numa matriz agarose (conforme descrito na EP 0132117), e eluído com uma mistura de acetonitrilo e hidróxido de amónio 0,1N (30:70). Fez-se nova purificação empregando cromatografia líquida de grande resultado com o uso de gel de sílica silanizado como suporte e acetonitrilo, formiato de amónio aquoso 0,1M (pH 7,3) (1:9) como eluente para dar UK-68.597 em forma pura.

EXEMPLO 2

Utilizaram-se 2 litros de um inóculo preparado conforme descrito no Exemplo 1 para inocular 70 litros de meio inóculo que tem a composição descrita no Exemplo 1 contido num fermentador de 100 litros. Este inóculo de segunda fase foi incubado a 28ºC. Com uma velocidade de agitação de 450 revoluções por minuto e um débito de ar de um volume de ar por volume de cultura por minuto. Depois de 48 horas de incubação, o inóculo foi utilizado para inocular 1200 litros de meio da composição seguinte, contida num fermentador de 2000 litros:

Meio de Fermentação

Ingrediente	Gramas/litro
Cerelose	10
Amido de milho	10

Farinha de soja	10
Cloreto de cobalto	0,002
Solúveis de destilaria	0,5
Cloreto de sódio	5
Carbonato de cálcio	1

O fermentador foi mantido a 28ºC, com arejamento e agitação a 160 revoluções por minuto. Decorridas 96 horas, o pH da cultura completa foi ajustado para pH 10,0 e a cultura foi filtrada por um filtro prensa previamente revestido com auxiliar de filtro. Os sólidos que continham os microorganismos foram separados, e o filtrado foi ajustado para pH 7,0. Fez-se o filtrado descer por uma coluna de resina Amberlite XAD-2 (Rohm & Haas), a coluna foi lavada com água e o antibiótico UK-68.597 eluído com acetona aquosa a 50%.

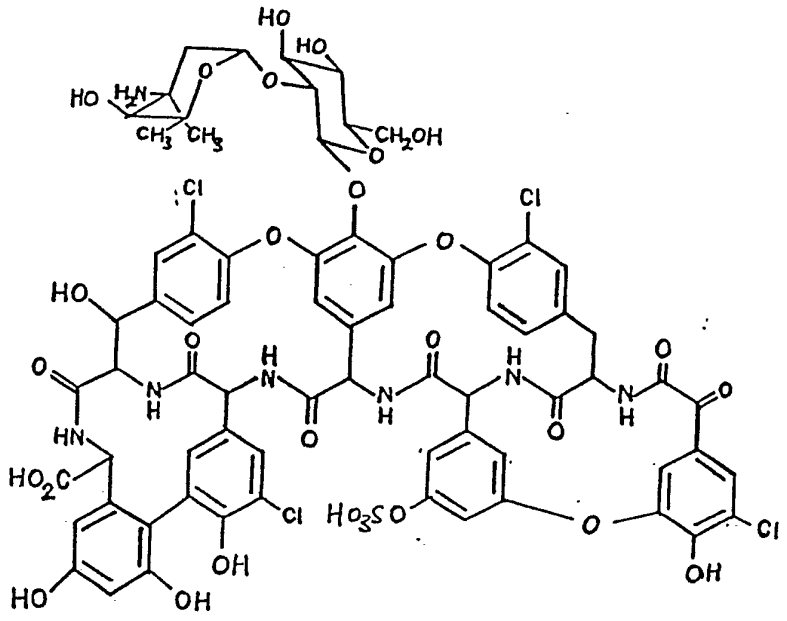
O eluato foi concentrado para 12 litros. Depois de diluição com 1,75 litros de formiato de amónio aquoso 0,1 M, carregaram-se 3,5 litros deste concentrado numa coluna Prep-Pak C-18 num sistema de cromatografia líquida de alta pressão Waters Prep 500. A coluna foi eluída, por sua vez, com os dissolventes seguintes:

Dissolvente	Volume (litro)
formato de amónio aquoso 0,1 M	3
formato de amónio aquoso 0,1 M, acetonitrilo (1:19)	4,5
formato de amónio aquoso 0,1 M, acetonitrilo (1:9)	1,3
água	0,9
acetonitrilo em água (3:7)	5,5

As fracções ricas em antibiótico foram concentradas e adsorvidas sobre resina Amberlite XAD-2. Eluição da resina com emprego de acetona aquosa a 50%, concentração das fracções relevantes e liofilização deram UK-68.597 em forma livre de sal.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S:

1ª. - Processo para a preparação de um antibiótico que tem a fórmula



e dos seus sais catiónicos farmaceuticamente aceitáveis, caracterizado pelo facto de compreender a cultura do microrganismo Actinoplanes sp. ATCC 53533 ou uma sua forma mutante ou recombinante capaz de produzir um antibiótico com a fórmula (I), em meios de cultura que contêm uma fonte assimilável de carbono, azoto e sais inorgânicos em condições de fermentação aeróbica submersa até ser obtida uma quantidade recuperavel do referido antibiótico.

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o referido antibiótico ser separado do meio de fermentação.

3ª.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o referido antibiótico ser recuperado sob a forma de uma preparação micélica ou por meio de secagem por aspersão do meio de fermentação completo.

4ª.- Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo facto de o referido antibiótico ser misturado com um alimento animal nutritivo.

5ª.- Processo para a preparação de uma composição alimentar nutritiva para gado vacum, porcos ou aves domésticas, caracterizado pelo facto de ser incluido no referido alimento um antibiótico obtido de acordo com a reivindicação 1, numa quantidade eficaz para promover crescimento e/ou melhorar a utilização do alimento pelos referidos gado vacum ou porcos ou para controlar infecções coccídicas em aves domésticas.

Lisboa, 14 de Outubro de 1987

J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA