

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT



(11) 159684 B

(21) Patentansøgning nr.: 4574/85

(22) Indleveringsdag: 08 okt 1985

(41) Alm. tilgængelig: 10 apr 1986

(44) Fremlagt: 19 nov 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(83) Deponering af mikroorganismer

(30) Prioritet: 09 okt 1984 US 658976 09 okt 1984 US 658977

(71) Ansøger: *Eli Lilly and Company; Lilly Corporate Center; Indianapolis; Indiana 46285, US

(72) Opfinder: Robert L. *Hamill; US, Raymond Che-fong *Yao; US, LaVerne Dwaine *Boeck; US

(51) Int.Cl.⁵

C 07 D 493/10

C 12 P 17/18

C 12 N 1/20

A 23 K 1/17

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

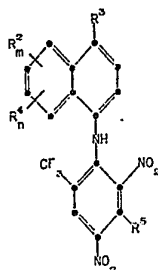
(54) Polyether-antibiotikum benævnt A80190 og salte deraf, fremgangsmåde til fremstilling af disse forbindelser og mikroorganismestamme til anvendelse ved udøvelse af fremgangsmåden, forbindelserne til anvendelse som veterinærprodukter og ved bekæmpelse af coccidiosis hos fjerkræ, fremgangsmåde til forøgelse af foderudnyttelseseffektiviteten hos drøvtyggende dyr og fremme af væksten af monogastriske dyr samt dyrefoderblandinger indeholdende forbindelserne

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

4574-85

Polyether-antibiotiket A80190 og dets salte og acyl-, alkylester-, acylester- og urethan-derivater med formlen



hvor R er hydrogen eller -CONHR₁ og R₁ er alkyl, aryl, alkylaryl, arylalkyl, halogenaryl, nitroaryl, halogenarylalkyl, alkoxyaryl, aryloxyaryl, arylcycloalkyl, acylaryl eller cycloalkyl, er nyttige midler til at forøge foderudnyttelsen hos dyr. Forbindelserne (I) er også nyttige antibakterielle og anticoccidiale midler, enten alene eller i synergistiske blandinger med nicarbazin, 4,4'-dinitrocarbanilid, visse naphthalenamin- og benzenamin-forbindelser eller metichlorpindol.

A8090 fremstilles ved submers aerob dyrkning af Actinomyces oligospora NRRL 15877 eller NRRL 15878.

DK 159684 B

Denne opfindelse angår et hidtil ukendt polyether-antibiotikum benævnt A80190 og farmaceutisk acceptable salte deraf med baser, en fremgangsmåde til fremstilling af disse forbindelser og en hidtil ukendt mikroorganisme-

5 stamme til anvendelse ved udøvelse af fremgangsmåden. Opfindelsen angår endvidere forbindelserne til anvendelse som veterinærprodukter og ved bekæmpelse af coccidiosis hos fjerkræ, fremgangsmåder til forøgelse af foderudnyttelseseffektiviteten hos drøvtyggende dyr og til fremme

10 af væksten af monogastriske dyr samt dyrefoderblandinger indeholdende forbindelserne.

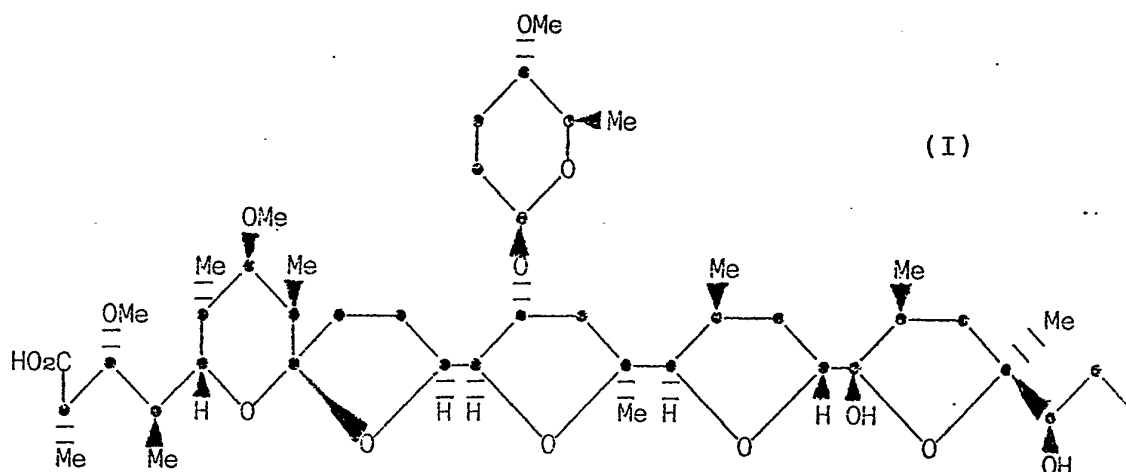
Westley (John W. Westley, "Polyether Antibiotics: Naturally Occurring Aid Ionophores, Vol. 1, Chemistry", Marcel Dekker: New York, 1983) har opdelt eksisterende polyethere efter klasse og type. Hvis man anvender Westley's

15 system, er A80190 et nyt medlem af klasse 1b, type (1), hørende til gruppen af polyethere, eftersom forbindelsen indeholder et spiroketal-system. Andre medlemmer af denne

20 gruppe omfatter A28695 A og B (US patentskrift nr. 3 839 558), A204I og II (US patentskrift nr. 3 705 238) og A-32887 (US patentskrift nr. 4 133 876).

Den omhandlede forbindelse, A80190, har den nedenfor viste struktur:

25



Karakteristika af A80190

Antibiotiket A80190 er blevet tildelt den ovenfor viste struktur (1) på basis af røntgenkrystallografiske undersøgelser. A80190 har (i sin frie syreform) følgende karakteristika:

Tilstandsform: Hvide krystaller (fra acetone-vand)

10 Smp.: 98 - 100 °C eller 120 - 122 °C (mere hyppigt); varieres sandsynligvis med grader af solvatisering;

15 $pK_a = 6,2$ (66 % vandigt dimethylformamid) $[\alpha]^{25}_D = -26^\circ$ (c 1, CHCl_3)

Molekylvægt: 828 (massespektrometri med feltdesorption)

20 Empirisk formel: $\text{C}_{44}\text{H}_{76}\text{O}_{14}$

UV: ingen absorbans

25 IR: (CHCl_3) figur 1; viser absorption ved følgende frekvenser (cm^{-1}): 3019, 2970, 2936, 2827, 1721, 1457, 1402, 1376, 1314, 1163, 1105, 1092, 1083, 1056, 1022, 1006, 989, 980, 945, 934, 917, 982 og 859

30

35

Grundstofanalyse:

		<u>Fundet</u>	<u>Beregnet</u>
	Carbon	63,35	63,77
5	Hydrogen	9,17	9,18
	Oxygen	27,10	27,05

10 Opløselighed: Uopløseligt i vand; opløseligt i lavere alkoholer såsom methanol, ketoner såsom acetone, estere såsom ethylacetat, halogenerede carbonhydrider såsom chloroform og carbonhydrider såsom diethylether, benzen, toluen og varm hexan.

15 A80190 indeholder en syrefunktion, som er i stand til at danne salte med baser. A80190 samt de farmaceutisk acceptable salte af A80190 er nyttige som antibiotika, som coccidiostater og som midler, der forøger effektiviteten af foderudnyttelsen hos dyr.

25 A80190 og dets salte (i det følgende "A80190-forbindelserne") er nyttige som antibakterielle og anticoccidiale midler. De forøger effektiviteten af foderudnyttelsen hos drøvtyggere, og de virker som væksthæmmende midler hos monogastriske dyr. Desuden udviser de insekticide, herbicide og antivirale virkninger. De er endvidere nyttige som ionophorer.

30 Opfindelsen angår endvidere synergistiske tilskudsmidler til fjerkræfoder, som består af A80190, eller farmaceutisk acceptable salte deraf, sammen med en forbindelse valgt blandt nicarbazin og 4,4'-dinitrocarbanilid. Disse tilskudsmidler er nyttige til at kontrollere coccidiosis hos dyr.

Saltene af A80190 er nyttige til at fraseparere og rense antibiotiket. De farmaceutisk acceptable salte er særligt nyttige. Sådanne salte udviser ringe eller slet ingen toxicitet over for varmblodede dyr. Som eksempler på salte af A80190 kan nævnes alkalimetal-, jordalkalimetal- og amin-salte.

Repræsentative og egnede alkalimetal- og jordalkalimetal-salte af A80190 omfatter natrium-, kalium-, lithium-, cæsium-, rubidium-, barium-, calcium- og magnesiumsalte. Som eksempler på egnede amin-salte af A80190 kan anføres ammoniumsaltet samt de primære, sekundære og tertiære C_1 - C_4 -alkylammonium- og hydroxy- C_2 - C_4 -alkylammoniumsalte. Eksempler på illustrative amin-salte omfatter salte dannet ved omsætning af A80190 med ammoniumhydroxid, methylamin, sec-butylamin, isopropylamin, diethylamin, diisopropylamin, ethanolamin, triethylamin og 3-amino-1-propanol.

Det er velkendt inden for det veterinærfarmaceutiske område, at selve formen af et antibiotikum som regel ikke er af større betydning, når man behandler et dyr med antibiotiket. I de fleste tilfælde vil de tilstande, der hersker i dyrets organisme, ændre medikamentet til en anden form end den form, hvorunder det blev indgivet. Den saltform, i hvilken medikamentet indgives, har derfor ikke større betydning. Imidlertid kan man vælge saltformen udfra hensyn til økonomi, bekvemmelighed og mangel på toxicitet.

Antibiotiket A80190 kan fremstilles ved dyrkning af en A80190-producerende stamme af *Actinomadura oligospora* under submerse aerobe dyrkningsbetingelser i et egnet medium, indtil der er opnået en væsentlig antibiotisk aktivitet. Antibiotiket kan udvindes ved forskellige isolations- og rensningsprocedurer, der vil være velkendte for fagmanden.

En ny *Actinomadura oligospora*-mikroorganisme som producerer antibiotiket A80190, blev isoleret fra en jordprøve fra Indien. Derefter blev en væsentligt forbedret variant, som fører til en forøget produktion af A80190, isoleret af LaVerne D. Boeck.

Kulturer af disse to A80190-producerende organismer er blevet deponeret i overensstemmelse med Budapesttraktaten i samlingen af stamkulturer hos the Northern Regional Research Center, Agricultural Research, North Central Region, 1815 North University Street, Peoria, Illinois, 61604, hvorfra de er tilgængelige for offentligheden under deponeringsnumrene NRRL 15877 (forældre-stammen) og NRRL 15878 (variant-stammen).

Taxonomiske undersøgelser af varianten er blevet foretaget af Frederick P. Mertz hos the Lilly Research Laboratories. På basis af disse undersøgelser er de to nye organismer blevet klassificeret som medlemmer af en ny art af slægten *Actinomadura*, for hvilken man har foreslået navnet *Actinomadura oligospora* sp. nov. Denne klassifikation er baseret på direkte laboratorie-sammenligninger med tilsvarende arter og gennemgang af publicerede beskrivelser [M. Goodfellow og G. Alderson, "Numerical Taxonomy of *Actinomadura* and Related *Actinomycetes*", J. Gen. Microbiol. 112:95-111 (1970); M. Goodfellow og K. P. Schaal, "Identification Methods for *Nocardia*, *Actinomadura* og *Rhodococcus*", p. 261 - 276 i F. A. Skinner og D. W. Lovelock (ed.), "Identification Methods for Microbiologists", 2nd ed., The Society for Applied Microbiology Technical Series No. 14, Academic Press, New York, 1979; L. H. Huang, "*Actinomadura macra* sp. nov., the Producer of Antibiotics P-47, 433 and CP-47,434". Int. J. Syst. Bacteriol. 30:565-568 (1980), og H. A. Lechevalier og M. P. Lechevalier, "A Critical Evaluation of the Genera of Aerobic *Actinomycetes*", p. 393-405 i H. Prauser (ed.), "The *Actinomycetales*", Gustav Fischer Verlag, Jena].

Anvendte metoder

De metoder, der anbefales af det internationale Streptomyces-projekt (ISP) til karakterisering af Streptomyces-arter [E. B. Shirling og D. Gottlieb, "Methods for Characterization of Streptomyces Species", Int. J. Syst. Bacteriol. 16:313-340 (1966)], er blevet fulgt sammen med visse supplerende forsøg (D. J. Blazevic og G. M. Ederer, "Principles of Biochemical Tests in Diagnostic Microbiology", John Wiley and Sons, Inc., New York, 1975).

Carbon-udnyttelsen blev bestemt med ISP nr. 9 basal-medium, hvortil der var sat filter-steriliserede carbon-kilder til en endelig koncentration på 1,0 %. Pladerne blev inkuberet ved 30 °C og aflæst efter 14 dages forløb.

Produktionen af melanoid-pigment (chromogeniciteten) blev bestemt med ISP nr. 1 (trypton-gærekstrakt-væske), ISP nr. 6 (pepton-gærekstrakt-jern-agar), ISP nr. 7 (tyrosin-agar) og modificeret ISP nr. 7, hvorfra tyrosinet var fjernet.

Stivelseshydrolysen blev bestemt ved at teste for tilstedeværelsen af stivelse ved hjælp af iod på ISP nr. 4 (agar af uorganiske salte og stivelse) plader (se Blazevic og Ederer, supra).

Morphologien blev undersøgt ved anvendelse af et optisk lysmikroskop. Et skanderende elektronmikroskop (SEM) blev benyttet til at studere sporeoverflade-ornamentikken.

NaCl-tolerancen blev målt ved at sætte NaCl til ISP nr. 2 agar til den ønskede koncentration.

ICSS-NBS Centroid Color Charts, standardprøve nr. 2106 (National Bureau of Standards, 1958, U.S. Department of Commerce, Washington, D.C.) og the Color Harmony Manual

(4th ed., Container Corporation of America Chicago, Illinois, 1958) blev benyttet til tildeling af farvenavne.

Isomererne af diaminopimelinsyre (DAP) og carbonhydraterne i hydrolysater af hele celler blev etableret ved de chromatografiske metoder beskrevet af Becker et al., [B. Becker, M. P. Lechevalier, R. E. Gordon og H. A. Lechevalier, "Rapid Differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by Paper Chromatography of Whole-cell Hydrolysates", *Appl. Microbiol.* 12:421-423 (1964)] og af Lechevalier [M. P. Lechevalier, "Identification of Aerobic Actinomycetes of Clinical Importance", *J. Lab. Clin. Med.* 71:934-944 (1968)].

Resistensen over for lysozymer blev målt ved metoder anbefalet af Gordon [R. E. Gordon og D. A. Barnett, "Resistance to Rifampin and Lysozyme of Strains of Some Species of *Mycobacterium* and *Nocardia* as a Taxonomic Tool", *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27, 176-178 (1971)].

Resistensen over for antibiotika blev målt ved anbringelse af skiver med antibiotisk sensitivitet på overfladerne af podede ISP nr. 2 agarplader.

Phosphatase og urease blev bestemt ved metoderne beskrevet af Blazevic, supra.

De mycoliske syrer blev bestemt ved en metode baseret på teknikker beskrevet af Minnikin [D. E. Minnikin, L. Alshamaony og M. Goodfellow, "Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia*, and Related Taxa by Thin-Layer Chromatographic Analysis of Whole-organism Methanolysates", *J. Gen. Microbiol.* 88:200-204 (1975)].

Phosphorlipid-analysen blev gennemført som beskrevet af Lechevalier [M. P. Lechevalier, C. De Bievre og H. Lechevalier, "Chemotaxonomy of Aerobic Actinomycetes: Phospho-

lipid Composition", Biochemical Systematics and Ecology
5, 249-260 (1977)].

Kultur-karakteristika

5 Væksten af organismen var generelt ringe på kemisk definerede medier, med bedre på komplicerede organiske medier. Der var fravær af luftmycelier med undtagelse af spormængder på ISP nr. 4 og natriumbutyrat-agar. Når der
10 var sporer til stede, havde disse en østers-hvid farve i Tresner og Backus-systemet [H. D. Tresner og E. J. Backhus, "System of Color Wheels for Streptomycete Taxonomy", Appl. Mikrobiol. 11:335-338 (1956)]. Farven af bagsiden var grågul til brun. Der produceredes ikke nogen opløselige pigmenter bortset fra et meget lyst brunt opløseligt
15 pigment i ISP nr. 2 og et mørkebrunt opløseligt pigment i gærdextrose-agar. Den efterfølgende tabel I viser disse kultur-karakteristika; hvor der til sammenligning er anført de tilsvarende karakteristika for den kendte stamme
20 *Actinomadura macra*.

25

30

35

34

Agar-medium		NRRL 15878	A.macra
ISP No. 2	G: R: Am: Sp:	God (fugtig overflade) 61.gy.brun Intet Meget lyst brunt	Rigelig (39.gy.ro) 43.m.rBr 56. dyb brun Intet Meget lyst brunt
ISP No. 3	G: R: Am: Sp:	Ringe 93.y grå Spor: b hvidt Små spredte individuelle klumper Intet	Jævn 5.m.pink Intet Intet
ISP No. 4	G: R: Am: Sp:	Ringe 93.y grå Spor: b hvidt Små spredte individuelle klumper Intet	Jævn til ringe 5 m pink Intet Intet
ISP No. 5	G: R: Am: Sp:	Ringe 93.y grå Intet Intet	God 48.v.O Intet Intet

(tabellen fortsætter)

(tabellen fortsætter)

TABEL I fortsat

5

10

20

25

30

35

Agar-medium		NRRL 15878	A.macro
Gær-dextrose	G:	Rigelig (fugtig overflade)	Rigelig (fugtig overflade)
	R:	81.d.gy.y brun	59.d.Br
	Am:	Intet	Svagt spor: gråt
	Sp:	Mørkebrunt	Mørkebrunt
Natrium-butyrat	G:	God	Jævn
	R:	93.y gråt	78.d.y brun
	Am:	Jævn: b hvidt	Intet
	Sp:	Intet	Intet
Calcium-malat	G:	Jævn	Jævn
	R:	93.y grå	26.s.y pink
	Am:	Intet	Intet
	Sp:	Intet	Intet

^aG = Vækst R = bagside Am = luftmycelium Sp = opløseligt pigment

Morphologiske karakteristika

Der var en sparsom produktion af sporekæder på ISP nr. 4 og natriumbutyarat-agar. Sporophorerne indeholdt omkring
5 10 sporer pr. kæde, og de var generelt snoede som i Rectus-flexibilis (RF) konfiguration. Imidlertid kunne der også observeres krogformede sporophorer. Lufthyferne havde en tendens til at klumpe sig sammen. Sporeformen var aflang, og størrelsen varierede fra 0,5 til 0,7 μm på den
10 ene led og fra 0,9 til 1,3 μm på den anden led. Den gennemsnitlige sporestørrelse var 1,1 x 0,6 μm . Sporeoverflade-ornamentikken var glat.

Fysiologiske karakteristika

15

I den efterfølgende tabel II er angivet carbonhydrat-udnyttelsesmønsteret for stammen i sammenligning med mønsteret for *A. macra*. ISP-medium nr. 9 blev benyttet som basal-medium. Ved at tilsætte vitamin B₁ eller ved at anvende Luedemann's medium [G. M. Luedemann og B. Brodsky, "Micromonospora carbonacea sp. n., an Everinomycin-producing Organism", Antimicrob. Agents Chemother. 1964, 47-52] opnåede man en svagt forbedret vækst, men ingen ændringer i carbon-udnyttelsen. Adonitol, cellobiose,
20 glucose og ribose blev udnyttet. En tvivlsom udnyttelse blev bemærket med fructose og xylose. Arabinose, cellulose, dextran, galactose, i-inositol, inulin, lactose, mannitol, mannose, melizitose, milibiose, raffinose, rhamnose, salicin, saccharose, trehalose og xylitol blev
30 ikke udnyttet til vækst.

TABEL IICarbon-udnyttelsesmønster for NRRL 15878 og A. macra^a

5	Carbon-kilde	NRRL 15878	A. macra
	kontrol	-	-
10	adonitol	+	-
	L-arabinose	-	-
	Cellobiose	+	-
	cellulose	-	ND
	dextran	-	ND
15	D-fructose	±	-
	D-galactose	-	±
	D-glucose	+	+
	i-inositol	-	±
	inulin	-	ND
20	D-lactose	-	-
	mannitol	-	-
	D-mannose	-	-
	D-melezitose	-	-
	D-melibiose	-	-
25	raffinose	-	-
	L-rhamnose	-	-
	ribose	+	±
	salicin	-	-
	saccharose	-	+
30	trehalose	-	+
	xylitol	-	ND
	D-xylose	±	±

a+ = udnyttet, - = ikke udnyttet

35 ± = tvivlsom udnyttelse, ND = ikke bestemt.

I den nedenstående tabel III er angivet stammens resistens over for forskellige antibiotika ved de angivne koncentrationer, og der er sammenlignet med resistensen af A. macra.

5

TABEL III

Resistens over for antibiotika hos NRRL 15878 og A. macra^a

10

15

20

25

30

Anti- biotikum	Koncentra- tion	NRRL 15878	A. macra
Bacitracin	10 enheder	+	-
Cephalothin	30 µg	+	+
Gentamicin	10 µg	-	-
Lincomycin	2 µg	+	+
Neomycin	30 µg	-	-
Oleandomycin	15 µg	-	-
Penicillin G	10 enheder	+	+
Rifampin	5 µg	+	+
Streptomycin	10 µg	-	+
Tetracyclin	30 µg	-	-
Tobramycin	10 µg	-	-
Vancomycin	30 µg	-	-

^a + = resistens (ingen inhiberingszoner)

- = sensitiv (inhiberingszoner)

35

NRRL 15878 voksede ved temperaturer fra 15 til 42 °C og tolererede op til 2 % NaCl. Organismen producerede katalase, phosphatase og urease.

- 5 NRRL 15878 virkede nedbrydende på casein, DNA, esulin og gelatine, men ikke på adenin, calciummalat, chitin, elastin, guanin, hippurat, hypoxanthin, keratin, stivelse, testosteron, tyrosin og xanthin.

10 Cellevæg-analyse

De hydrolyserede hele celler indeholdt meso-isomeren af diaminopimelinsyre. De sukkerarter, som var til stede i hydrolysaterne af hele celler, var følgende: glucose,
15 mannose, madurose og ribose. Typen af cellevæg ifølge Becker, supra, er type III, og sukkermønsteret er af type B (Lechevalier, 1968). En kvalitativ analyse af methanolysater af hele celler for mycoliske syrer gav tvivlsomme resultater. Det er således tvivlsomt, hvorvidt
20 kulturen indeholder mycoliske syrer. Man fandt et phosphorlipid-mønster af typen PI. Type PI indeholder ikke nogen nitrogenholdige phosphorlipider, og denne type er karakteristisk for slægten Actinomadura (Lechevalier, 1977).

25

Identitet af stammen

NRRL 15878 har en cellevæg af type III, et sukkermønster for de hele celler af type B og et phosphorlipid-mønster
30 af type PI. Denne chemotaxonomiske information samt de generelle kultur-karakteristika er i overensstemmelse med, at stammen er tilskrevet slægten Actinomadura Lechevalier og Lechevalier (Lechevalier, 1970).

- 35 En sammenligning af disse karakteristika med de karakteristika, som er angivet i publicerede beskrivelser af kendte arter af Actinomadura, viser, at kulturen minder

om *A. pelletieri* (Laveran 1906) *Lechevalier* og *Lechevalier*, 1070, og til *A. macra* (Huang, 1080).

5 Kulturen minder først og fremmest om *Actinomadura pelle-*
tieri ved fraværet, eller i det mindste den sjældne fore-
komst, af luftmycelier. Når der produceres sporophorer,
har disse en morfologi, der svarer til den i litteratu-
ren beskrevne morfologi (Goodfellow, 1979). De to kultu-
rer besidder også en række fælles fysiologiske karak-
10 teristika. Forskellene i kultur-egenskaber og de fysio-
logiske forskelle er imidlertid tilstrækkelige til at
skelne de to kulturer som adskilte arter.

Ifølge *Lechevalier* (1970) repræsenteres *A. pelletieri*
15 udelukkende af en gruppe af kliniske isolater. Oprindelig
beskrivelse af *A. pelletieri*, som blev givet af Gordon
[R. E. Gordon, "Some Criteria for the Recognition of
Nocardia madurae (Vincent) Blanchard", J. Gen. Microbiol
45:355-364 (1966)] beskriver organismen som værende en
20 klar rød kultur. NRRL 15878 producerer derimod ikke dette
pigment. *A. pelletieri* nedbryder elastin, hypoxanthin,
keratin og tyrosin, udnytter trehalose, reducerer nitrat
og vokser ved 45 °C, men NRRL 15878 har ikke disse
karakteristika. NRRL 15878 udnytter adonitol og cello-
25 biose, nedbryder esculin og DNA og er resistent over for
lysozymer, hvorimod *A. pelletieri* ikke har disse karak-
teristika. Den nye kultur må derfor opfattes som værende
en anden art end *A. pelletieri*.

30 På grund af kulturens lighed med *A. macra* foretog man
samtidige laboratoriesammenligninger. NRRL 15878 og *A.*
macra har mange fælles egenskaber. De er begge ude af
stand til at nedbryde adenin, calciummalat, chitin, ela-
stin, guanin, keratin, stivelse, testosteron, tyrosin og
35 xanthin. Ingen af organismerne frembringer H₂S eller me-
lanoid-pigmenter. Begge kulturer nedbryder casein, DNA og
gelatine, de producerer catalase og phosphatase, og de

syntetiserer et polyether-antibiotikum. De har samme tolerance over for NaCl, og de vokser begge på natriumbutytrat, ligesom de har den samme type cellevæg. *A. macra* og NRRL 15878 afviger fra hinanden hvad angår carbon-udnyttelsesmønsteret, nedbrydning af esculin og hypoxanthin, resistens over for antibiotika, temperaturområde, urease-produktion og reduktion af nitrat.

A. macra og NRRL 15878 har mange kultur-karakteristika fælles. I særdeleshed fraværet af luftmycelier. Der er imidlertid også signifikante forskelle. Bagsidefarven af NRRL 15878 er grå til gulbrun, mens *A. macra* på mange medier frembringer en rød farve. Denne forskel ses klart på glucose-asparagin-agar. På dette medium frembringer *A. macra* en pink luftig vækst, hvilket ikke er tilfældet for NRRL 15878. Disse sammenligninger er vist i tabel I.

Morphologien af NRRL 15878 svarer til morphologien af *A. macra*. De har begge ringe udviklede luftmycelier, som hører til Rectus-flexibilis (RF) afsnittet ifølge Pridham [T. G. Pridham, C. W. Hesseltine og R. C. Benedict, "A Guide for the Classification of Streptomyces According to Selected Groups", Appl. Microbiol. 6:52-79 (1957)]. Sporeoverflade-ornamentikken er glat.

Forskellene og lighederne imellem NRRL 15878 og *A. macra* er opsummeret i tabel IV.

TABEL IV:Sammenligning imellem NRRL 15878 og A. macra

5		
	Ligheder	Forskelle
10	Morphologi	Antibiotisk resistens
	Fysiologiske egenskaber	Carbon-udnyttelsesmønster
	Polyether-syntese	Kultur-karakteristika
15	Knaphed på lufthyfer	Nedbrydning af esculin
		Nitrat-reduktion
20		Sporeform og -størrelse
		Temperaturområde
		Urease-produktion
25		

Tabel V viser disse ligheder og forskelle i detaljer.

30

35

19

5

10

15

20

25

30

35

TABEL V

Sammenligning mellem NRRL 15878 og A. macra

Test	NRRL 15878	A. Macra
Dannelse af lufthyfer	sjældent	sjældent
Carbon-udnyttelsesmønster	forskellige (ses i tabel II)	
Catalase-nedbrydning af:		
adenin	-	-
calciummalat	-	-
casein	+	+
chitin	-	-
DNA	+	+
elastin	-	-
esculin	+	-
gelatine	+	+
guanin	-	-
hypoxanthin	-	+
keratin	-	-
stivelse	-	-
testosteron	-	-
tyrosin	-	-
xanthin	-	-

(tabellen fortsætter)

20
TABEL V fortsat

5

10

15

20

25

30

35

Test	NRRL 15878	A. Macra
Vækst i flydende medier	farveløs	rød-orange
Vækst på Na-butytrat	+	+
H ₂ S-produktion	-	-
Melanoid-pigmenter	-	-
NaCl-tolerance	2 procent	2 procent
Nitrat-reduktion	-	+
Phosphatase	+	+
Polyether-syntese	+	+
Resestens-mønster for antibiotika	forskellige (se tabel III)	ND
Resistens over for lysozym	+	brun orange
Bagsidefarve	grå brun	brunt
Opløseligt pigment	brunt	RF
Sporekæder	RF	glat
Sporeoverflade	glat	15 - 37 °C
Temperatur	15 - 42 °C	15 - 37 °C
Urease-produktion	+	-
Sporeform	aflang	oval
Sporestørrelse	0,5 - 0,7 x 0,9 - 1,3 µm	0,8 - 1,0 x 1,2 - 2,0 µm

Disse sammenligninger viser, at kulturerne NRRL 15877 og NRRL 15878 er signifikant forskellige fra andre arter af *Actinomadura*, og de repræsenterer stammer af en ny art, for hvilken man har foreslået navnet *Actinomadura oligospora* sp. nov. Det specifikke tilnavn (*O. ligo.spor.us*: L. Adj. "oligo" få, L.n. "sporus" sporer, "oligospora" få sporer) refererer til den relative mangel på sporophorer i organismen. Stammen NRRL 15878 er typestamme for *A. oligospora*.

Ligesom det er tilfældet med andre organismer, kan egenskaberne af den A80190-producerende kultur ifølge opfindelsen, *Actinomadura oligospora* NRRL 15878, undergå variationer. Rekombinanter, mutanter eller varianter af stammen kan opnås ved i sig selv kendte metoder. For eksempel kan man frembringe mutanter ved behandling med forskellige kendte fysiske og kemiske mutagener, såsom ultraviolet lys, røntgenstråler, gammastråler og kemikalier, såsom N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin. Naturlige og inducerede varianter, mutanter og rekombinanter af *Actinomadura oligospora* NRRL 15878, med væsentlig samme egenskaber er også anvendelige ved fremstilling af A80190.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af A80190 eller salte deraf er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 2 anførte.

Dyrkningsmediet, som benyttes til dyrkning af *Actinomadura oligospora*-kulturer, kan være valgt blandt en række forskellige medier. Med henblik på at opnå en økonomisk produktion, et optimalt udbytte og en bekvem isolation af produktet foretrækker man imidlertid bestemte dyrkningsmedier. Således er glucose eksempelvis en foretrukken carbonhydrat-kilde ved fermentering i stor målestok, selv om man også kan anvende ribose, xylose, fructose, galactose, mannose, mannitol, kartoffeldextrin og lignende. Glycerol og lipider giver kun en ringe (eller slet ingen)

vækst eller antibiotisk produktion, når de anvendes som primær carbon-kilde. I kombination med glucose forøger de biomassen, men de nedsætter den antibiotiske produktion.

- 5 En foretrukken nitrogen-kilde er collagen-hydrolysat, men enzym-hydrolyseret casein, kød-peptoner, fiskemel, levermel og lignende er også nyttige nitrogen-kilder. Blandt de nærende uorganiske salte, som kan inkorporeres i dyrkningsmedierne, er de sædvanlige opløselige salte, som kan
10 frembringe ioner af zink, natrium, magnesium og calcium samt ammonium-, chlorid-, carbonat-, sulfat- og nitrat-ioner.

- Væsentlige sporstoffer, som er nødvendige for organismens
15 vækst og udvikling, bør også forefindes i dyrkningsmediet. Sådanne sporstoffer optræder sædvanligvis som urenheder i andre bestanddele af mediet i mængder, som er tilstrækkelige til at imødekomme organismens vækstkrav. Skumning er sædvanligvis ikke noget problem, men såfremt
20 det er nødvendigt, kan man tilsætte små mængder (dvs. 0,2 ml/l) af et anti-skummiddel såsom polypropylenglycol, når der er tale om fermentering i stor målestok.

- For at frembringe betydelige mængder af antibiotiket
25 A80190 foretrækker man at anvende submers aerob fermentering i tanke. Små mængder af A80190 kan opnås ved ryste-flaskedyrkning. På grund af den tidsforsinkelse i den antibiotiske produktion, som sædvanligvis forekommer ved podning af store tanke med sporeformen af organismen, foretrækkes det at anvende et vegetativt podestof. Dette
30 vegetative podestof fremstilles ved at pøde et lille volumen af dyrkningsmediet med sporeformen eller med myceliefragmenter af organismen, således at man opnår en frisk, aktivt voksende kultur af organismen. Det vegetative podestof overføres derefter til en større tank. Mediet for det vegetative podestof kan være de samme medium,
35 som benyttes til større fermenteringer, men andre me-

dier er også velegnede.

Den A80190-producerende organisme frembringer A80190, når den dyrkes ved temperaturer mellem ca. 25 og ca. 37 °C.
5 En optimal temperatur for A80190-produktionen synes at være omkring 30 - 32 °C.

Som det er sædvanligt ved submerse aerobe dyrkningsprocesser, blæser man steril luft ind i reaktionsbeholderen
10 fra bunden, mens mediet omrøres med konventionelle turbine-omrørere. Den maksimale optagelse af oxygen ved fermenteringen under de hidtil anvendte betingelser har ikke oversteget omkring 0,22 mmol/liter/minut. I en fuldstændigt afskærmet 165 liter fermenteringsbeholder, som
15 indeholder omkring 115 liter væske, er en beluftningshastighed på 0,125 v/v/minut og en omrøringshastighed på 200 omdrejninger pr. minut tilstrækkeligt til at opretholde niveauet af opløst oxygen på 30 % mætning eller derover.

20 Produktionen af antibiotiket A80190 kan følges under fermenteringen ved at teste prøver af væsken for antibiotisk aktivitet over for organismer, som vides at være sensitive over for antibiotiket. En prøveorganisme, som er
25 nyttig til at teste A80190, er *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Forsøget gennemføres bekvemt ved anvendelse af en pladetest med agar-fordybninger.

Efter at A80190 er blevet dannet under submerse aerobe
30 fermenteringsbetingelser, kan antibiotiket udvindes fra fermenteringsmediet ved i sig selv kendte metoder. Den antibiotiske aktivitet, som produceres ved fermentering af den A80190-producerende organisme, optræder både i den filtrerede væske og i myceliemassen. Den maksimale udvin-
35 ding af A80190 opnås derfor ved, at man først filtrerer mediet for at separere væsken fra myceliemassen. Den filtrerede væske og myceliemassen kan derefter renses

separat, således at de hver især giver en mængde A80190. Man kan anvende en række forskellige teknikker til denne rensning. En foretrukken teknik til rensning af den filtrerede væske består i, at man indstiller væsken til en pH-værdi på omkring 9 og ekstraherer den ved et egnet opløsningsmiddel, såsom ethylacetat. Det til ekstraktionen benyttede opløsningsmiddel kan derefter afdampes under vakuum, hvorved man opnår den del af A80190-antibiotiket, der hidrører fra fermenteringsvæsken. En foretrukken metode til rensning af myceliemassen består i at ekstrahere den fraseparerede mycelie-filterkage med et passende opløsningsmiddel, såsom methanol eller acetone. Det til ekstraktionen anvendte opløsningsmiddel afdampes derefter under vakuum, hvilket efterlader en koncentreret vandig opløsning. Denne vandige opløsning indstilles derefter til en pH-værdi på omkring 9 og ekstraheres med et passende opløsningsmiddel, såsom ethylacetat. Opløsningsmidlet afdampes derefter under vakuum, hvorved man opnår mycelie-delen af A80190. De to portioner af A80190-komplekset, der hidrører fra dyrkningsvæsken og myceliet, renses yderligere ved konventionelle procedurer. En foretrukken procedure involverer chromatografi over silica-gel.

Alternativt kan man anvende de faste bestanddele fra dyrkningen, herunder mediets bestanddele og myceliet, uden ekstraktion eller separation, men fortrinsvis efter fjernelse af vand, som en kilde for A80190. Efter produktionen af A80190 kan man for eksempel tørre hele fermenteringsvæsken ved lyophilisering, ved tromletørring eller ved azeotropisk destillation og tørring. Det tørrede materiale blandes derefter direkte i en foderblanding.

De kationiske alkalimetall- og jordalkalimetalsalte af A80190 fremstilles ved procedurer, som sædvanligvis anvendes ved fremstilling af kationiske salte. For eksempel opløser man den frie syreform af A80190 i et egnet op-

løsningsmiddel såsom acetone. Til opløsningen sætter man en 1/3 volumen vand, hvorefter man indstiller den resulterende opløsning til en pH-værdi på omkring 9 - 10 med basen svarende til det ønskede kationiske salt (eksempelvis NaOH, KOH). Det således dannede salt kan isoleres ved rutinemetoder, såsom filtrering eller afdampning af opløsningsmidlet.

En foretrukken metode til dannelsen af salte består i at opløse A80190 (syreform) i et med vand ublandbart opløsningsmiddel såsom ethylacetat, tilsætte et tilsvarende volumen vand og indstille blandingen til pH 10 med den tilsvarende kationiske base (eksempelvis NaOH, KOH eller lignende). Den fraseparerede organiske fase vaskes med vand og koncentrerer til tørhed. Resten lyophiliseres fra dioxan. Saltet kan krystalliseres fra et passende opløsningsmiddel, såsom pentan.

Saltene, som dannes med organiske aminer, kan fremstilles på tilsvarende måde. For eksempel kan man sætte den gasformige eller flydende amin til en opløsning af A80190 i et passende opløsningsmiddel, såsom acetone. Derefter kan man fjerne opløsningsmidlet og den overskydende amin ved inddampning.

De omhandlede A80190-forbindelser inhiberer væksten af bakterier og svampe, som er pathogene over for dyre- og planteliv. Den inhiberende virkning af A80190 er illustreret i den efterfølgende tabel VI. Aktiviteten blev målt ved den konventionelle skivediffusions-metode (skiver på 6 mm blev dyppet i opløsninger indeholdende 1 mg af forbindelsen pr. ml opløsning; skiverne blev anbragt på agarplader podet med testorganismen).

TABEL VIAntibakterial virkning af A80190

5

		Inhiberingszone
		(mm diameter)
<u>Testorganisme</u>		
	Staphylococcus aureus	17
10	Bacillus subtilis	23
	Micrococcus luteus	20
	Mycobacterium avium	21
	Saccharomyces pastorianus	10
	Neurospora crassa	14
15	Candida albicans	14

Et vigtigt aspekt ved den antimikrobielle virkning af A80190-forbindelserne har relation til forbindelsernes virkning over for anaerobe bakterier. De minimale inhiberingskoncentrationer (MIC'-værdier), ved hvilke A80190 inhiberer forskellige anaerobe bakterier, som bestemt ved standardagar-fortyndingsforsøg, er opsummeret i den efterfølgende tabel VII. Endepunkterne blev aflæst efter 24 timers inkubation.

25

30

35

TABEL VIIAnaerobe bakterie-isolaters følsomhed over for A80190

5	Anaerobe bakterier	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
	<i>Clostridium difficile</i> 2994	<0,5
	<i>Clostridium perfringens</i> 81	<0,5
10	<i>Clostridium</i> <i>septicum</i> 1128	<0,5
	<i>Eubacterium aerofaciens</i> 1235	<0,5
	<i>Peptococcus asaccharolyticus</i> 1302	1
	<i>Petococcus prevoti</i> 1281	<0,5
	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> 1428	1
15	<i>Peptostreptococcus intermedius</i> 1624	1
	<i>Propionibacterium acnes</i> 79	1
	<i>Bacteroides fragilis</i> 111	>128
	<i>Bacteroides fragilis</i> 1877	>128
	<i>Bacteroides fragilis</i> 1926B	>128
20	<i>Bacteroides thetaiotamicron</i> 1438	>128
	<i>Bacteroides melaninogenicus</i> 1856/28	>128
	<i>Bacteroides melaninogenicus</i> 2736	>128
	<i>Bacteroides vulgatis</i> 1211	16
	<i>Bacteroides corrodens</i> 1874	>128
25	<i>Fusobacterium symbiosum</i> 1470	8
	<i>Fusobacterium necrophorum</i> 6054A	16

30 Anticoccidial virkning er en væsentlig egenskab ved de omhandlede A80190-forbindelser. I den efterfølgende tabel VIII er opsummeret resultaterne af en vævskultur-screening in vitro af A80190-forbindelser imod *Eimeria tenella*:

TABEL III

Aktivitet af A80190 over for *Eimeria tenella* in
vitro

5

Forbindelse	Koncentration ($\mu\text{g/ml}$)				
	5	1	0,2	0,04	0,008
A80190	C ^a	C	A	A	A

15

^aC = cytotoxisk

A = aktiv

20 Til behandling af coccidiosis hos fjerkræ indgiver man en
ikke-toxisk anticoccidial mængde af en A80190-forbindelse
til inficerede eller modtagelige fugle, fortrinsvis oralt
på daglig basis. A80190-forbindelsen kan indgives på man-
ge måder, men det er mest bekvemt at tilføre den sammen
25 med et farmaceutisk acceptabelt bærestof, som fortrinsvis
er fuglenes foder. Det er nødvendigt at tage en række
forskellige faktorer i betragtning, når man skal bestemme
en passende koncentration af A80190-forbindelsen, men de
indgivne mængder ligger generelt i området fra omkring to
30 til omkring 100 ppm i foderet, fortrinsvis i området fra
omkring 15 til omkring 50 ppm. Opfindelsen angår også et
tilskudsmiddel til fjerkræfoder, der kan anvendes i for-
bindelse med behandling af coccidiosis, hvilke midler be-
står af en effektiv mængde af en A80190-forbindelse til
35 behandling af coccidiosis i kombination med et passende
bærestof.

De omhandlede midler til kontrol af coccidiosis hos fjerkræ består af

1) en A80190-forbindelse i kombination med

5

2) en forbindelse valgt blandt

a) nicarbazin,

b) 4,4'-dinitrocarbanilid,

10

Nicarbazin og 4,4'-dinitrocarbanilid er beskrevet i US patentskrift nr. 2 731 382. Nicarbazin er et kompleks af 4,4'-dinitrocarbanilid og 2-hydroxy-4,6-dimethylpyrimidin, men forbindelsen 4,4'-dinitrocarbanilid udviser også anticoccidial virkning alene; se Science 122, 244 (1955).

15

Komponenterne, som indgår i kombinationerne af en A80190-forbindelse med forbindelserne 2(a)-(b), benyttes i mængder, som i kombination er synergistiske med hensyn til mindst én organisme, som fremkalder coccidiosis. Generelt er de maksimale mængder, som benyttes i kombinationerne, de samme som de maksimale mængder til anticoccidial behandling med de individuelle komponenter. De nedre grænser er generelt mindre end de grænser, som kræves ved terapeutisk behandling med de individuelle komponenter. Midlerne er generelt sammensætninger, som indeholder (1) fra omkring 2 til omkring 100 ppm af en A80190-forbindelse og (2) (a) fra omkring 5 til omkring 125 ppm nicarbazin, (b) fra omkring 25 til omkring 150 ppm 4,4'-dinitrocarbanilid. A80190-forbindelserne er særligt effektive, når de indgives sammen med nicarbazin. De foretrukne kombinationer indeholder fra omkring 2 til omkring 20 ppm af en A80190-forbindelse med mellem ca. 5 og ca. 50 ppm nicarbazin.

20

30

35

En anden vigtig egenskab ved A80190-forbindelserne er deres evne til at forbedre foderudnyttelsen hos dyr. For

eksempel bevirker A80190-forbindelserne en forbedret foderudnyttelse hos drøvtyggere, som har en udviklet vomfunktion.

- 5 Effektiviteten af foderudnyttelsen kan måles ved at observere produktionen og koncentrationen af propionat-forbindelser i vommen ved anvendelse af metoden beskrevet af Arthur P. Raun i US patentskrift nr. 3 794 732 (se især eksempel 5). Tabel IX viser forholdet imellem koncentrationerne af flygtige fedtsyrer (VFA) i A80190-behandlede
10 kolber og de tilsvarende koncentrationer i kontrolkolberne ved dette forsøg.

15

20

25

30

35

TABEL IX

Virkning af A80190 på foderudnyttelsen hos drøvtyggere^a

A80190 Doserings µg/ml	propionat ^b	acetat ^b	butyrat ^b	Total VFA/ kontrol VFA mmol/l
1	1,185*	0,986	0,851	0,916
1	1,403*	0,892	0,813	0,887
0,3	1,220*	0,970	0,819	0,967
1	1,247*	1,016	0,706	0,857
3	1,368*	0,998	0,611	0,963
1	1,566	0,926	0,529	0,913

*tosidet t-test; signifikant ved $P < 0,01$; $C_3 > 95$ procent øvre konfidensgrænse;

^aTre gennemførte forsøg

^b molforhold mellem behandlet og kontrol

Det ses af tabellen, at A80190 forøger propionat-koncentrationerne og dermed foderudnyttelsen i forhold til kontrollerne, når de indgives oralt til drøvtyggere i mængder på mellem ca. 0,02 mg/kg/dag og ca. 1,5 mg/kg/dag. De foretrukne mængder til indgivelse er mellem ca. 0,05 og ca. 0,5 mg/kg/dag.

En foretrukken indgivelsesmetode består i at blande forbindelsen med dyrets foder. Imidlertid kan forbindelsen også indgives på andre måder, eksempelvis i form af tabletter, afmålte portioner, store piller eller kapsler. Formuleringen af disse forskellige dosisformer kan foretages ved metoder, som er velkendte inden for det veterinær-farmaceutiske område. Den individuelle dosisenhed bør indeholde en mængde af én af de omhandlede forbindelser, som står i direkte relation til den passende daglige dosis for dyret, som skal behandles.

Opfindelsen angår endvidere dyrefoderblandinger, der som aktiv bestanddel indeholder en af de omhandlede forbindelser. Disse fodersammensætninger er således tilpasset, at de forøger foderudnyttelsen, og disse fodersammensætninger består af f.eks. dyrets foder, hvori der er iblandet fra omkring 2,5 til 25 gram af en A80190-forbindelse pr. ton.

Som beskrevet ovenfor er de omhandlede A80190-forbindelser aktive over for anaerobe bakterier, især Clostridium perfringens. A80190-forbindelserne er derfor nyttige til behandling eller forebyggelse af enteritis hos kyllinger, svin, kvæg og får. A80190-forbindelserne er også nyttige til behandling af enterotoksæmi hos drøvtyggere.

De omhandlede A80190-forbindelser er også anvendelige som ormemidler. For eksempel kan A80190 udrydde Caenorhabditis elegans på niveauer så lave som 20 ppm.

A80190-forbindelserne er også nyttige til behandling af svinedysenteri. Således bevirker A80190 en inhibering af væksten af *Treponema hyodysenteriae*, som er en svinedysenteri-fremkaldende organisme, på niveauer så lave som 0,39 µg/ml. En foretrukken metode til indgivelse til svin består i at inkorporere en passende mængde af en A80190-forbindelse i svinets foder eller drikkevand. En passende mængde vil afhænge af, hvorvidt formålet med behandlingen er at forebygge eller at helbrede infektion. Sædvanligvis er den koncentration af den aktive forbindelse, som kræves for at forebygge en infektion, lavere end den koncentration, som kræves for at eliminere en infektion hos dyr, som allerede er angrebet. Generelt er mængder af A80190-forbindelsen på mellem ca. 20 og ca. 100 gram pr. ton foder effektive til at forebygge infektioner. Mængder på mellem ca. 100 og ca. 500 g A80190-forbindelse pr. ton foder anbefales til behandling af svin, som lider af dysenteri. Disse mængder tilvejebringer koncentrationer på mellem ca. 1 og ca. 5 mg/kg legemsvægt pr. dag (prophylaktisk behandling) eller mellem ca. 5 og ca. 25 mg/kg legemsvægt pr. dag (behandling af inficerede dyr). Når A80190-forbindelsen sættes til dyrets drikkevand, anbefaler man mængder på mellem ca. 0,01 og ca. 0,05 gram (prophylaktisk) eller mellem ca. 0,05 og ca. 0,25 gram (terapeutisk) af forbindelsen pr. liter vand.

Med opfindelsen tilvejebringes endvidere dyrefoderblandinger til behandling af svinedysenteri, hvilke sammensætninger består af et svinefoder og en effektiv mængde af en A80190-forbindelse til dette formål. Som tidligere anført vil en effektiv mængde af forbindelsen typisk ligge i området fra omkring 20 til omkring 500 gram A80190-forbindelse pr. ton foder.

A80190-forbindelserne kan indgives oralt eller parenteralt til dyrene. De kan også indgives ved insufflation, dvs. ved at blæse antibiotiket, i form af et præpareret

støv, ind i et lukket rum, hvor dyrene eller fjerkræet befinder sig. Dyrene eller fjerkræet vil herved indånde det præparerede støv, som findes i luften. Det præparerede støv kan også trænge ind i kroppen igennem øjnene
5 (en proces, som benævnes intraokular injektion).

Den mest praktiske måde til indgivelse af A80190-forbindelserne består i at formulere disse i dyrenes foder. Til dette formål kan man anvende en række foderstoffer, herunder de sædvanlige foderstoffer af tørfodertype, flydende foderstoffer og foderstoffer formet til tabletter. Selv om den foretrukne metode således består i at blande den aktive forbindelse med dyrets foder, kan forbindelsen også indgives på andre måder, f.eks. i form af tabletter,
15 afmålte portioner, store piller eller kapsler. Den individuelle dosisenhed bør indeholde en mængde af A80190-forbindelsen, som står i direkte relation til den korrekte daglige dosis for dyret, som skal behandles.

20 Metoderne til formulering af medikamenter i dyrefoder er velkendte. En foretrukken metode består i at fremstille en koncentreret medikament-forblanding, som derefter benyttes til fremstilling af præparerede foderstoffer. Typiske forblandinger kan indeholde fra omkring 2,2 til omkring 440 g af den aktive forbindelse pr. kilo forblanding. Sådanne forblandinger kan være enten flydende eller
25 faste præparater.

Den endelige formulering af foderstofferne til dyr eller fjerkræ vil afhænge af den mængde medikament, som skal indgives. Man kan anvende de sædvanlige metoder til formulering, blanding og findeling af foderstoffer, når man skal fremstille foderstoffer, der indeholder en A80190-forbindelse.
30

35 De omhandlede A80190-forbindelser kan formuleres til parenteral indgivelse ved metoder, der er velkendte inden

for det veterinær-farmaceutiske område. Effektive injicerbare sammensætninger, som indeholder A80190-forbindelserne, kan have form af enten suspensioner eller opløsninger. Når sammensætningen har form af en opløsning, 5 bliver A80190-forbindelsen opløst i et fysiologisk acceptabelt bærestof. Sådanne bærestoffer består af et egnet opløsningsmiddel, konserveringsmidler såsom benzylalkohol (såfremt dette er nødvendigt) samt puffere. De anvendelige opløsningsmidler omfatter eksempelvis alkoholer, 10 glycoler eller inerte olier, såsom vetabilske olier eller højt raffinerede mineralolier.

Sammensætninger i form af injicerbare suspensioner fremstilles ved, at man anvender en non-solvent, dvs. en 15 væske, der ikke virker som opløsningsmiddel for forbindelsen sammen med hjælpestoffer. Denne non-solvent kan f.eks. være vand eller en glycol, såsom polyethylenglycol.

20 Passende fysiologisk acceptable hjælpestoffer er nødvendige for at holde forbindelsen suspenderet i sammensætningen, som har form af en suspension. Hjælpestofferne kan være valgt blandt fortykkelsesmidler såsom carboxymethylcellulose, polyvinylpyrrolidon, gelatine og alginater. 25 Mange overfladeaktive midler er også nyttige til at suspendere de aktive forbindelser. Lecithin, alkylphenol-polyethylenoxid-addukter, naphthalensulfonater, alkylbensulfonater og polyoxyethylen-sorbitan-estere er nyttige suspenderingsmidler i flydende non-solventer.

30 Mange substanser, som påvirker hydrophiliciteten, densiteten og overfladespændingen af den flydende non-solvent, kan medvirke ved fremstillingen af injicerbare suspensioner i de individuelle tilfælde. For eksempel kan 35 silicone-baserede anti-skummidler, glycoler, sorbitol og sukkerarter være nyttige suspenderingsmidler.

Ved fremstillingen af puddere eller pulvere til indgivelse ved insufflation bliver forbindelserne typisk blandet med talkum, diatomejord eller andre inerte substanser, som virker som hjælpestoffer.

5

De omhandlede A80190-forbindelser er også nyttige som insecticider og acaricider. For eksempel kan A80190 bekæmpe følgende insekter på niveauer så lave som de i parenteserne angivne niveauer: myggelarver (<50 ppm),
10 spyfluelarver (35 ppm), voksne husfluer (35 ppm) og mexikanske bønnefrøbiller og sydlige "hørorme" (<100 ppm). A80190 er også aktiv over for mider, såsom den toplettede ederkoppemide, ved indgivelse i mængder på helt ned til 25 ppm.

15

De omhandlede A80190-forbindelser har også herbicid virkning. For eksempel kan A80190 udrydde fingeraks, sennep og kvinoa i mængder på 2,25 kg/ha, enten præ-emergent eller post-emergent.

20

De omhandlede A80190-forbindelser er aktive over for poliovirus. For eksempel viser vævskulturforsøg, at A80190 er virksom over for polio III-virus i et niveau på 2000 µg/ml.

25

Antibiotiket A80190 udviser iontransport-egenskaber og hører derfor til ionophorerne (ion-bærende substanser) (se B. C. Pressman, Alkali metal chelators the ionophores, i "Inorganic Biochemistry", Volume 1, G. L. Eichhorn, Elsevier, 1973). I en koncentration på
30 0,5 µg/ml udviser A80190 ionophorisk virkning. Aktiviteten med Na^+ , K^+ og Rb^+ er bedre end med Cs^+ eller Li^+ . Ved en lavere koncentration (0,2 µg/ml) udviste A80190 imidlertid en endnu større ionophorisk effekt med Cs^+ end
35 med Na^+ som kation.

Man kan derfor anvende A80190, når man ønsker en selektiv

fjernelse af bestemte kationer. Eksempler på sådanne anvendelser omfatter fjernelse og genvinding af sølvioner fra opløsninger inden for fotografi, fjernelse af toksiske kationer fra strømme af industrispildevand, inden sådanne
5 strømme ledes ud i omgivelserne, samt afsaltning af havvand. A80190 kan benyttes som den ene komponent i en ion-specifik elektrode (se O. Kedem et al., US patentskrift nr. 3 753 887, 21. august 1973).

10 A80190 ændrer kation-permeabiliteten hos såvel naturlige som kunstige membraner. A80190 kan derfor benyttes som komponent i en membran, som skal anvendes til selektiv transport af kationer imod en koncentrationsgradient. En potentiel anvendelse af denne egenskab ligger i udvindingen af tunge ædelmetaller på kommerciel basis; se E. L.
15 Cussler, D. F. Evans og Sister M. A. Matesick, Science 172, 377 (1971) .

Endnu et aspekt ved de omhandlede A80190-forbindelser er,
20 at de er aktive som inhibitorer for enzymet ATPase. Dette enzym, som er et alkalimetal-sensitivt enzym, der findes i cellemembraner, er involveret i den energi, som er nødvendig for den aktive transport. Ved "aktiv transport" forstås den energikrævende serie af operationer, hvorved
25 intracellulære og ekstracellulære væsker opretholder deres sammensætninger. Inhibitorer for ATPase reducerer den energi, som kræves til den aktive transport. Forsøg in vitro har vist, at A80190 inhiberer mitochondriernes ATPase med en halv-effektiv koncentration (IC_{50}) på 0,5
30 $\mu\text{g/ml}$.

De omhandlede A80190-forbindelser er også potentielle cardiotoniske midler.

35 Opfindelsen illustreres nærmere ved de følgende eksempler.

EKSEMPEL 1Fremstilling af A801905 A. Rysteflaskefermentering af A80190

Kulturen *Actinomadura oligospora* NRRL 15878, enten som en lyophiliseret tablet eller som en suspension holdt i flydende nitrogen, benyttes til at pøde et udsåningsmedium med følgende sammensætning:

	<u>Ingrediens</u>	<u>Mængde (%)</u>
	Glucose	1,0
15	Opløselig stivelse	2,0
	Gærekstrakt	0,5
	Enzymatisk hydrolysat af casein*	0,5
	CaCO ₃	0,1
20	Demineraliseret vand	op til 1 liter

NaOH tilsættes for at hæve pH i mediet til omkring 7,2 inden sterilisering.

25 *"NZ Amine A", Sheffield Chemical Co.,
Norwich, N.Y.

Skråkulturer eller plader fremstilles ved at sætte 2,5 % agar til udsåningsmediet. Den podede skråkultur inkuberes ved 30 °C i et tidsrum på mellem ca. 10 og ca. 14 dage. Den modne skråkultur skræbes med et sterilt redskab for at løsne sporerne og fjerne myceliemåtten. Omkring en fjerdedel af de løsnede sporer og den således opnåede kulturvækst benyttes til at pøde 50 ml af et medium i første trin.

Det podede medium i første trin inkuberes i et 250 ml

Erlenmeyer-kolbe ved 30 °C i omkring 48 timer på et rysteapparat, der roterer i en cirkelbevægelse (5,08 cm) med en hastighed på 250 omdrejninger pr. minut.

- 5 Dette inkuberede medium i første trin (0,4 ml) benyttes til at pøde 50 ml af et produktionsmedium med følgende sammensætning:

	<u>Ingrediens</u>	<u>Mængde (%)</u>
10	Glucose	3,0
	"N-Z amin A"	0,4
	Collagen-hydrolysat*	0,5
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,05
15	CaCO ₃	0,2
	Koldt ledningsvand	op til 1 liter

(Inden sterilisering justeres pH til 7,0)

- 20 *"IPC 3", Inland Industrial Molasses Co.,
Dubuque, Iowa.

- 25 Det podede produktionsmedium inkuberes i en 250 ml Erlenmeyer-kolbe med stor munding ved 30 - 32 °C i 8 til 10 dage på et rysteapparat, der roterer i en cirkelbevægelse (5,08 cm) med en hastighed på 250 omdrejninger pr. minut.

B. Tank-fermentering af A80190

- 30 Med henblik på at opnå et større volumen podestof benytter man 10 ml af et inkuberet medium i første trin, fremstillet som beskrevet i afsnit A, til at pøde 400 ml af et vækstmedium i andet trin, som har den samme sammensætning som mediet i første trin. Dette vegetative medium
- 35 i andet trin inkuberes i en to liter Erlenmeyer-kolbe med stor munding i omkring 48 timer ved 30 °C på et rysteapparat, der roterer i en cirkelbevægelse (5,08 cm)

med en omdrejningshastighed på 250 omdrejninger pr. minut.

Det således fremstillede inkuberede vegetative medium i
5 andet trin (800 ml) benyttes til at pøde 100 liter ster-
rilt produktionsmedium, fremstillet som beskrevet i af-
snit A. Det podede produktionsmedium får lov at fermentere
i en 165 liter fermenteringstank under omrøring i 8
til 10 dage ved en temperatur på 30 til 32 °C. En begræn-
10 set luftgennemstrømning (0,12 - 0,25 v/v/m) og en lav
omdrejningshastighed (150 - 200 omdrejninger pr. minut) i
beholderen bevirker, at der opretholdes et niveau af
opløst oxygen på over 30 % luftmætning.

15 C. Isolation af A80190

Hele fermenteringsvæsken fra to 100 liter tanke blev kom-
bineret (207 liter) og filtreret igennem en filterpresse
ved hjælp af "Hyflo supercel". Den filtrerede myceliekage
20 blev ekstraheret ved hjælp af cirkulerende methanol (40
liter) igennem filterpressen. Man kan også benytte ace-
tone som ekstraktionsmiddel. Methanolekstrakten, som kon-
centreredes i vakuum til et volumen på omkring 15 liter,
blev kombineret med filtratet af fermenteringsvæskerne
25 (182 liter). Blandingen blev indstillet til pH 9 ved
hjælp af 1 N natriumhydroxid, og den resulterende opløs-
ning blev ekstraheret med et tilsvarende volumen ethyl-
acetat. Ethylacetat-ekstrakten blev koncentreret til et
volumen på omkring 700 ml. Til den koncentrerede ekstrakt
30 sættes 1 liter vand, og pH blev indstillet til 9,0 med
natriumhydroxid, hvorefter blandingen blev ekstraheret to
gange med 1 liter toluen, idet man holdt pH på 9,0.
Toluenekstrakterne blev kombineret og koncentreret i
vakuum, hvilket gav en olieagtig rest, der indeholdt
35 A80190.

Resten blev opløst i toluen (100 ml) og overført til en

kolonne indeholdende 2 liter silicagel (Woelm, 70 - 150 mesh) i toluen. Kolonnen blev først elueret med 10 liter toluen og derefter med 10 liter af hver af de to toluen-ethanol-blandinger 49:1 og 48:2. Der opsamledes 5 fraktioner på 1 liter. Elueringen blev overvåget ved bioanalyse og TLC. De fraktioner, der indeholdt A80190, blev kombineret og koncentreret. Resten blev opløst i dioxan og frysetørret, hvilket gav 13,6 g rå A80190.

10 D. Rensning af A80190

20,4 g rå A80190, opnået fra fire 100 liter tanke som beskrevet ovenfor blev opløst i 200 ml acetonitril. Opløsningen blev overført til en kolonne indeholdende 2 15 liter silicagel (Woelm, 70 - 150 mesh) i acetonitril. Kolonnen blev vasket med 10 liter acetonitril og elueret sekvensvis med blandinger af acetonitril og acetone (95:5, 2 l), (9:1, 10 l), (4:1, 10 l) og (7:3, 10 l), idet der opsamledes fraktioner på 1 liter. Elueringen 20 blev fulgt ved bioanalyse under anvendelse af Bacillus subtilis. De fraktioner, der indeholdt A80190, blev kombineret og koncentreret. Resten blev opløst i dioxan og frysetørret til opnåelse af 15,8 g rensset A80190.

25 E. Krystallisation af A80190

28,2 g rensset A80190 blev opløst i 500 ml acetone. Der tilsattes 500 ml vand, og pH blev indstillet til 5,0 med fortyndet saltsyre. Den resulterende opløsning fik lov at 30 henstå ved stuetemperatur i 20 timer, således at der kunne indtræde krystallisation. Krystallerne blev fraseparet ved filtrering, vasket med vand og tørret i en vakuumovn, hvilket gav 25,9 g krystallinsk A80190 (syreform). Fig. 1 viser det infrarøde absorptionsspektrum af 35 A80190 i chloroform.

EKSEMPEL 2Fremstilling af natriumsaltet af A80190

- 5 300 mg A80190 (syreform) blev opløst i 30 ml acetone. Der tilsattes 10 ml vand, og pH blev indstillet til 10 med NaOH. Opløsningen blev koncentreret til en olieagtig rest, som blev opløst i dioxan og frysetørret til opnåelse af et amorft hvidt pulver (smp. 145 - 150 °C).
- 10 Produktets molekylvægt bestemt ved massespektrometri med feltdesorption (FDMS) var 850. IR-spektroskopi i CHCl_3 , vist på fig. 2, udviser absorptionsmaksima ved følgende frekvenser (cm^{-1}): 2962, 2934, 2885, 2825, 1719, 1569, 1455, 1397, 1377, 1358, 1314, 1285, 1243, 1162, 1104,
- 15 1074, 1057, 1025, 987, 979, 936, 922, 895 og 847.

EKSEMPEL 3Alternativ fremstilling af natriumsaltet af A80190

- 20 5 g A80190 (syreform) blev opløst i 500 mg ethylacetat, og der tilsattes 500 ml vand. Blandingen blev indstillet til pH 10 ved hjælp af 5N NaOH, og der omrørtes i 15 minutter for at opretholde pH uændret. Ethylacetatfasen
- 25 blev frasepareret og vasket med 500 ml vand, hvorefter den koncentreredes til tørhed under vakuum. Resten blev opløst i 100 ml dioxan og frysetørret til opnåelse af 4,1 g af natriumsaltet af A80190.
- 30 Det til udvaskningen anvendte vand fik lov at henstå ved stuetemperatur natten over, og krystallerne, som herved dannedes, blev frafiltreret og tørret. Disse krystaller bestod af A80190 på syreform (smp. 115 - 120 °C).

EKSEMPEL 4Krystallisation af natriumsaltet af A80190

5 Natriumsaltet af A80190 (1 g) i amorf form blev opløst i pentan (10 ml), og opløsningen fik lov at henstå ved stuetemperatur i 3 dage (hvorved opløsningsmidlet afdampede til et volumen på omkring 5 ml). Krystallerne, som herved dannedes, blev frafiltreret og tørret under
10 vakuum, hvilket gav 593 mg af det krystallinske natriumsalt af A80190 med et smp. på 225 - 230 °C. Forskellen i smeltepunkt i forhold til det amorge udgangsmateriale afspejler de forskellige fysiske tilstandsformer.

15 EKSEMPEL 5Chromatografisk identifikation af A80190I. TLC på silicagel

20 System: acetonitrilacetone (1:1)

$$R_f = 0,59$$

Detektering: Bacillus subtilisVanillin-H₂SO₄-spray

25

II. HPLC

Adsorbent: "μBondapak C18" (4 x 300 mm kolonne)

Opløsningsmiddelsystem: acetonitril:tetrahydrofuran
30 H₂O (6:1:3) indeholdende 1 %
H₃PO₄; justeret til pH 3,0
med NH₄OH

Detektering: refraktometer

Strømningshastighed: 3,0 ml/min

35 Retentionstid: 9,7 min.

EKSEMPEL 6

A80190 fremstilles ved metoden beskrevet i eksempel 1,
idet der anvendes kulturen Actinomadura oligosporus NRRL
5 15877.

EKSEMPEL 7A80190-modificeret kyllingefoder til coccidiosis-kontrol

10

Et afbalanceret foderstof med høj energi beregnet til op-
fodring af kyllinger med henblik på hurtig vægtforøgelse
fremstilles efter følgende recept:

15	<u>Ingrediens</u>	<u>%</u>	<u>kg</u>
	Formalet gul majs	50	454
20	Sojabønne mel opløsningsmiddel- ekstraheret, afskallet og for- malet, 50 % protein	31,09	282,3
	Animalsk fedt (oksetalg)	6,5	59
25	Tørret fiskemel med opløse- lige additiver (60 % protein)	5,0	45,4
	Opløselige rester fra destillation	4,0	36,3
30	Dicalciumphosphat foderkvalitet	1,8	16,3
	Calciumcarbonat	0,8	7,3

35

	<u>Ingrediens</u>	<u>%</u>	<u>kg</u>
	Vitamin-forblanding (repræsenterende vitamin-		
5	erne A, D, E, K og B ₁₂ , cholin, niacin, pantothen-syre, riboflavin, biotin samt glu- cose som fyldstof)	0,5	4,5
10	Spormineralblanding (repræsenterende MnSO ₄ , ZnO, KI, FeSO ₄ og CaCO ₃)	0,2	1,8
	2-Amino-4-hydroxysmørsyre		
15	(hydroxy-analog til methionin)	0,1	0,9
	A80190 (Na-salt)	0,01	0,1

20 De ovenfor angivne substanser blandes ved anvendelse af
standardteknikker til foderblanding. Kyllinger, som fod-
res med dette foderstof, og som gives vand ad libitum, er
beskyttet imod at blive udsat for coccidiosis. De opnåede
vægtforøgelser kan sammenlignes med de resultater, som
opnås med coccidiosis-frie kyllinger, som fodres med en
25 tilsvarende foderblanding uden indhold af medikament.

EKSEMPEL 8

A80190-forbedret foder til slagtekvæg

30

Et afbalanceret foderstof med højt kornindhold til slag-
tekvæg fremstilles som følger:

35

	<u>Ingrediens</u>	<u>%</u>	<u>kg</u>
	Finmalet majs	67,8	615,6
5	Knuste majscolber	10	90,8
	Dehydratiseret lucernemel, 17 % protein	5	45,4
10	Afskallede formalede soja- bønner, opløsningsmiddel- ekstraherede, 50 % protein	9,9956	90,8
	Rørsukkersirup	5	45,4
15	Urinstof	0,6	5,5
	A80190 (Na-salt)	0,0044	0,04
20	Dicalciumphosphat, foderkvalitet	0,5	4,54
	Calciumcarbonat	0,5	4,54
25	Natriumchlorid	0,3	2,72
	Spormineralblanding	0,03	0,27

30

35

	<u>Ingrediens</u>	<u>%</u>	<u>kg</u>
	Vitamin A og D ₂ blanding*	0,07	0,64
5	Vitamin E blanding**	0,05	0,45
	Calciumpropionat	0,15	1,36
10	*Indhold pr. kg: Ca. 4405285 I.E. vitamin A; 500440 I.E. vitamin D ₂ og 850 g sojabønner tilsat 1 % olie.		
15	**Tørret majs fra spritfremstilling indeholdende ca. 44052 I.E. d- α -tocopherylacetat pr. kg.		
20	Det blandede foder presses til tabletter. Ved en gennem- snitlig daglig indgivelse på 6,8 kg foderstof pr. dyr be- virker foderstoffet en gennemsnitlig tilførsel på 300 mg A80190 (Na-salt) pr. dyr pr. dag.		

EKSEMPEL 9

A80190-forbedret svinefoder

25 Et afbalanceret foderstof til svin med smågrise fremstil-
les som følger:

30

35

	<u>Ingrediens</u>	<u>%</u>	<u>kg/ton</u>
	Formalet gul majs	65,10	591,1
5	Sojabønneolie og -mel, ekstraheret og afskallet	18,50	168
	Tørret roepulp	10,00	90,8
10	Dicalciumphosphat	2,90	26,3
	Calciumcarbonat	1,20	10,9
	Vitaminblanding ¹	1,10	10
15	Salt (NaCl)	0,55	5
	Cholinchlorid, 25 %	0,35	32
20	Spormineralblanding ²	0,15	1,4
	Vitamin A blanding ³	0,10	0,9
	Hydroxyanalog til methionin	<u>0,05</u>	<u>0,4</u>
25	Total	100,00	908

1) Hvert kilo blanding indeholder følgende: 77,161 USP enheder vitamin D₂, 2205 I.E. vitamin E, 441 mg riboflavin, 1620 mg pantothersyre, 2205 mg niacin, 4,4 mg vitamin B₁₂, 441 mg vitamin K, 19180 mg cholin, 110 mg folinsyre, 165 mg pyridoxin, 110 mg thiamin og 22 mg biotin.

2) Hvert kilo blanding indeholder følgende: 50 g mangan som mangansulfat, 100 gr zink som zinkcarbonat, 50 g jern som ferrosulfat, 5 g kobber som kobberoxid, 1,5 g iod som kaliumiodid samt mindst 130 g og højest 150 g

calcium som calciumcarbonat.

3) Hver kilo blanding indeholder 6.613800 USP enheder vitamin A.

5

Til 90,8 kg af dette foder fremstiller man en forblanding ved at sætte A80190 (10 g) til en lille mængde opløsningsmiddelekstraherede sojabønner, formale blandingen i en morter og fortynde den formalede blanding til 0,454 kg med en yderligere mængde opløsningsmiddelekstraherede sojabønner. Denne forblanding sættes derefter til 90,8 kg af det ovenfor beskrevne svinefoder, og der blandes ved hjælp af standardteknik. Dette medikament-holdige foder giver et niveau på 100 g A80190 pr. ton basalfoder. Dette foder indgives til den drægtige so i mindst én dag, fortrinsvis i 7 til 10 dage forud for faringen, og efter faringen indgives foderet så længe det er ønskeligt.

Større eller mindre mængder af det medikament-holdige foderstof med varierende niveauer af A80190 fremstilles ved at variere mængden af A80190 i forblandingen og/eller mængden af basalfoderet.

En so indgives mellem 2,2 og 22 g A80190 pr. 100 kg foder. Det medikament-holdige foder holdes tilgængeligt ad libitum sammen med vand. Sædvanligvis indtager en so omkring 2,7 - 3,6 kg foder pr. dag.

EKSEMPEL 10

30

A80190-formulering til smågrise

A80190 opløses i en lille mængde ethanol. Denne ethanolopløsning suspenderes i polyethylenglycol (molvægt 200). Den opnåede suspension koncentreres, således at hver enhedsdosis har et volumen på omkring 0,5 til 2 ml. Sådanne suspensioner indgives til unge grise i mængder på

mellem 1,10 og 110 mg pr. kg tre gange dagligt.

EKSEMPEL 11

5 Forbedret foder til kontrol af svinedysenteri

Man fremstiller en forblanding ved standardmetoder, idet man anvender følgende ingredienser:

10	<u>Ingrediens</u>	<u>g/kg</u>
	A80190-forbindelse	150,0
	Calciumsilicat	20,0
15	Calciumcarbonat (østerskal-mel)	<u>830,0</u>
	Totalvægt	1000 g

Denne forblanding sættes til et kommercielt svinefoder, idet man anvender standardteknikker til blanding, således at der opnås et slutteligt indhold af den aktive forbindelse på 100 g/ton.

EKSEMPEL 12

25

En demonstration af den synergistiske virkning af nicarbazin i kombination med A80190 blev gennemført på følgende måde: Slagtekyllinger, som var en uge gamle, blev fordelt i bure i grupper på fem og fodret med enten et medikament-holdigt foder eller et kontrolfoder, typisk i 30 1 dag, inden de blev inficeret med oocyster af en coccidiosis-fremkaldende organisme. Kyllingerne blev holdt på deres respektive foderrationer i et givet tidsrum, typisk 7 dage. Der blev foretaget fire gentagelser 35 for hver behandling.

Kyllingerne blev podet med 200000 oocyster af Eimeria

acervulina (Lilly stamme 59), 60000 oocyster af *Eimeria maxima* (stamme FS-177) og 40000 oocyster af *Eimeria tenella* (stamme FS-155).

- 5 Resultaterne af forsøgene fremgår af nedenstående tabeller. Det ses, at forekomsten af tarmlæsioner reduceres på synergistisk vis i forhold til reduktionen ved stigende doser af de enkelte bestanddele, hvilket omend i mindre markant grad også gør sig gældende for vægtforøgelsen,
10 der også overstiger den ved enkeltkomponenterne opnåede.

15

20

25

30

35

Tarmtlæsioner (point)

5	Nicarbazin	A80190 (p.p.m.).					
	(p.p.m.)	0	4	8	12	16	20
10	0	9,13	8,63	5,94	3,50	1,19	0,0
	20	9,13	5,13	0,19	0,13	0,0	
	30	8,88	1,63	0,50	0,0		
	40	8,90	0,56	0,0			
	50	8,56	0,0				
	125	0,08					

15 Tyktarmtlæsioner (point)

20	Nicarbazin	A80190 (p.p.m.).					
	(p.p.m.)	0	4	8	12	16	20
25	0	3,44	2,63	1,75	1,19	0,19	0,0
	20	3,19	2,38	0,31	0,56	0,06	
	30	3,50	0,94	0,19	0,0		
	40	3,17	1,00	0,58			
30	50	3,19	0,54				
	125	0,33					

30

35

Vægtforøgelse (gram pr. kylling)

5	Nicarbazin	A80190 (p.p.m.)					
	(p.p.m.)	0	4	8	12	16	20
	0	147	236	265	251	272	261
	20	159	268	284	266	279	
	30	174	279	258	283		
	40	211	258	289			
10	50	222	276				
	125	279					

15

20

25

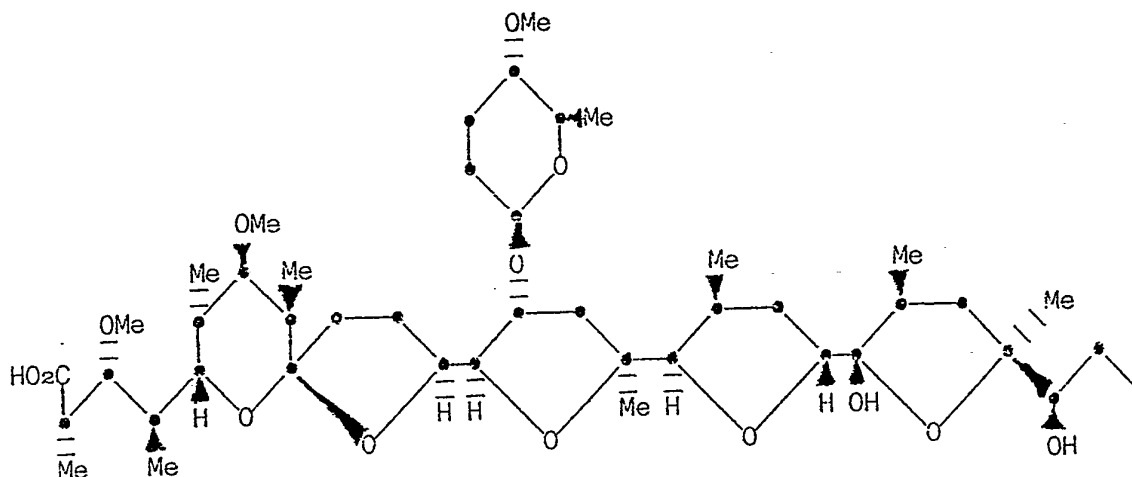
30

35

P a t e n t k r a v :

1. Polyether-antibiotikum benævnt A80190 med formelen

5



og farmaceutisk acceptable salte deraf med baser.

20

2. Fremgangsmåde til fremstilling af en A80190-forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at man dyrker *Actinomadura oligospora* NRRL 15877 eller NRRL 15878 eller en mutant deraf med væsentlig samme egenskaber i et dyrkningsmedium, der indeholder assimilerbare kilder for carbon, nitrogen og uorganiske salte, under submerse aerobe fermenteringsbetingelser, indtil antibiotikum A80190 er dannet, hvorefter man separerer A80190 fra dyrkningsmediet og om ønsket omsætter det med en base til dannelse af et farmaceutisk acceptabelt salt.

30

3. Forbindelse A80190 og farmaceutisk acceptable salte deraf ifølge krav 1 til anvendelse som veterinærprodukt eller som sundhedsfremmende produkt til dyr.

35

4. Forbindelse A80190 og farmaceutisk acceptable salte deraf ifølge krav 1 til anvendelse ved bekæmpelse af

coccidiosis hos fjerkræ.

5. Fremgangsmåde til forøgelse af foderudnyttelseseffektiviteten hos drøvtyggende, k e n d e t e g n e t ved, at
5 dyret oralt indgives en effektiv propionatforøgende mængde af forbindelsen A80190 eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf ifølge krav 1.

6. Fremgangsmåde til fremme af væksten af monogastriske
10 dyr, k e n d e t e g n e t ved, at dyret indgives en effektiv mængde af forbindelsen A80190 eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf ifølge krav 1.

7. Dyrefoderblanding, k e n d e t e g n e t ved, at den
15 som aktiv bestanddel indeholder A80190 eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf i følge krav 1.

8. Fjerkræfoderblanding ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at den indeholder en første komponent, som er
20 A80190 eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf ifølge krav 1, og en anden komponent, som er valgt blandt nicarbazin, og 4,4'-dinitrocarbanilid.

9. Fjerkræfoderblanding ifølge krav 8, k e n d e t e g n e t ved, at den anden komponent er nicarbazin.
25

10. Actinomadura oligosporus NRRL 15878 til anvendelse ved udøvelse af fremgangsmåden ifølge krav 2.

30

35

