



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

227691

(11) (B2)

(22) Přihlášeno 17 12 81
(21) (PV 4512-82)
(32) (31)(33) Právo přednosti od 18 12 80
(217960) Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 26 08 83

(45) Vydáno 15 02 86

(51) Int. Cl.³

A 23 K 1/17
C 12 P 21/04

(72) Autor vynálezu

HERSHBERGER CHARLES LEE, NEW PALESTINE, MERKEL KURT EDGAR,
MOORESVILLE, WEEKS ROBERT EDGAR, WILD GENE MURIEL, INDIANAPOLIS,
INDIANA (Sp. st. a.)

(73) Majitel patentu

ELI LILLY AND COMPANY, INDIANAPOLIS, INDIANA (Sp. st. a.)

(54) Krmivo pro hospodářská zvířata, zvláště přežvýkavce

1

Vynález se týká krmiva pro hospodářská zvířata, zvláště přežvýkavce, urychlujícího růst, s obsahem antibiotika A-4696, faktoru G.

Antibiotikum A-4696G je glykopeptid, který je možno získat pěstováním kmene *Actinoplanes missouriensis*, například ATCC 31681 ve vodném živném prostředí v submerzní kultuře za aerobních podmínek.

Po skončené fermentaci se antibiotikum izoluje ze surového fermentačního prostředí adsorpcí na pryskyřice a čistí se chromatografií.

Antibiotikum A-4696G je zásaditá látka, která tvoří s kyselinami adiční soli, jejichž výroba rovněž spadá do oboru vynálezu. Adiční soli antibiotika A-4696G s kyselinami, přijatelné z farmaceutického hlediska jsou zvláště výhodnými sloučeninami.

V průběhu přihlášky se pod pojmem "sloučenina A-4696G" rozumí antibiotikum A-4696 faktor G nebo některá sůl, přijatelná z farmaceutického hlediska.

Předmětem vynálezu je krmivo pro hospodářská zvířata, zvláště přežvýkavce a drůbež resp. předsměs k jeho vytvoření, vyznačující se tím, že obsahuje 0,01 až 90 hmotnostních % antibiotika A-46960, které je glykopeptidem se dvěma aminoskupinami zásadité povahy, ve formě dihydrochloridu jde o bílou krystalickou sloučeninu, v podstatě rozpustnou ve vodě a nerozpustnou v organických rozpouštědlech jako methylalkoholu, acetonu, chloroformu a benzenu,

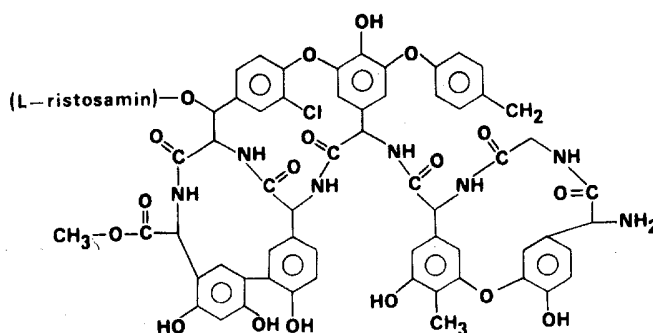
s přibližným procentuálním prvkovým složením 52,90 % uhlíku, 4,29 % vodíku, 6,39 % dusíku, 30,96 % kyslíku a 5,46 % chloru,

s absorpčním maximem v ultrafialovém světle v bromidu draselném při 3384 (široké), 2924 (slabé), 1730 (hrb), 1659 (intenzivní), 1616 (slabé), 1590 (slabé), 1504 (intenzivní), 1488 (hrb), 1427 (středně silné), 1289 (slabé), 1226 (dublet), 1214 (dublet), 1179 (slabé), 1119 (slabé), 1060 (intenzivní), 1028 (slabé), 1015 (hrb), 986 (slabé), 899 (velmi slabé), 881 (velmi slabé), 815 (slabé), 801 (hrb), 769 (hrb), 731 (hrb), a 711 (slabé) cm^{-1} ,

s absorpčním maximem v ultrafialovém světle ve vodě při 279 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 53$),

s volnou formou, kterou možno titrovat kontinuálně v rozmezí pH 3,5 až 13,5 při elektrometrické titraci v 66% vodném dimethylformamidu,

při hydrolýze po dobu 70 minut v 5% vodném roztoku kyseliny chlorovodíkové při varu pod zpětným chladičem se vytváří pseudoglykon vzorce



nebo jeho adiční soli s kyselinou, přijatelné z farmaceutického hlediska.

Antibiotikum A-4696G je antibakteriální látka, která je zvláště účinná proti gram-pozitivním bakteriím. Mimoto podporuje antibiotikum A-4696G růst u zvířat.

Sloučenina A-4696G nebo její adiční soli s kyselinami, přijatelné z farmaceutického hlediska se připravují tak, že se pěstuje mikroorganismus *Actinoplanes missouriensis* ATCC 31681 ve vodném živném prostředí s obsahem využitelných zdrojů uhlíku, dusíku a anorganických solí v submerzní kultuře za aerobních podmínek do nahromadění antibiotika.

Antibiotikum A-4696G nebo jeho adiční soli s kyselinami, přijatelné z farmaceutického hlediska zvyšují využití krmiva u přežvýkavců při perorálním podání. Sloučeninu je možno podávat přežvýkavcům v krmivu nebo v doplňkovém krmivu, které obsahuje příslušné množství antibiotika A-4696G nebo jeho adiční soli s kyselinami.

Antibiotikum A-4696G nebo jeho sůl s kyselinou, přijatelná z farmaceutického hlediska může být rovněž použita ke zrychlení růstu u kuřat. V tomto případě se příslušné množství této látky podává kuřatům v krmivu nebo v pitné vodě.

Antibiotikum A-4696G ve formě dihydrochloridu je bílá krystalická látka. Při elementární analýze dihydrochloridu bylo prokázáno následující přibližné procentuální složení: uhlík 52,90 %, vodík 4,29 %, dusík 6,39 %, kyslík 30,96 %, (vypočítáno jako rozdíl), chlor 5,46 %. Antibiotikum A-4696G má přibližnou molekulovou hmotnost 1700.

Absorpční spektrum v infračerveném světle pro dihydrochlorid antibiotika A-4696G v bromidu draselném je znázorněno na přiloženém výkresu. Absorpční maxima je možno pozorovat při následujících frekvencích v cm^{-1} : 3384 (široké), 2924 (slabé), 1730 (hrb), 1659 (intenzivní), 1616 (slabé), 1590 (slabé), 1504 (intenzivní), 1488 (hrb), 1427 (středně silné), 1289 (slabé), 1226 (dublet), 1214 (dublet), 1179 (slabé), 1119 (slabé), 1060 (intenzivní), 1028 (slabé), 1015 (hrb), 986 (slabé), 899 (velmi slabé), 881 (velmi slabé), 815 (slabé), 801 (hrb), 769 (hrb), 751 (hrb) a 711 (slabé).

Při elektrometrické titraci antibiotika A-4696G v 66% vodném dimethylformamidu při počátečním pH 7,89 se titruje stoupající množství v rozmezí pH 3,5 až 11,5.

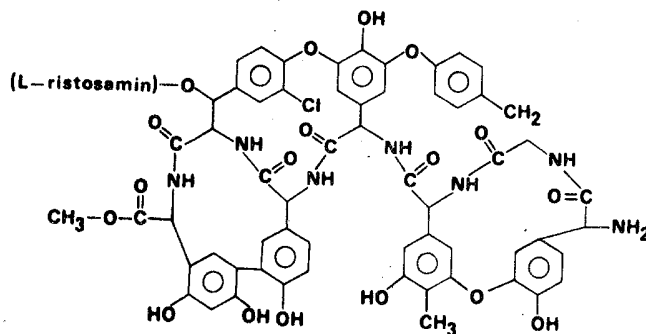
Absorpční spektrum dihydrochloridu antibiotika A-4696G v ultrafialovém světle ve vodě má absorpční maxima při 279 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 53$).

Dihydrochlorid antibiotika A-4696G je rozpustný ve vodě, avšak nerozpustný v rozpouštědlech jako methanolu, acetonu, diethyletheru, chloroformu, benzenu a podobně.

Kromě volné látky a hydrochloridů je možno tvořit i další adiční soli antibiotika A-4696G s kyselinami, jejichž výroba rovněž tvoří součást vynálezu. Vhodnými solemi antibiotika A-4696G jsou soli, které je možno získat standardními reakcemi s organickými anorganickými kyselinami, jako jsou kyselina sírová, chlorovodíková, fosforečná, octová, jantarová, citronová, mléčná, maleinová, fumarová, palmitová, žlučová, pamoová, mucinová, D-glutaminová, D-kafeová, glutarová, glykolová, ftalová, vinná, mravenčí, laurová, stearová, salicylová, methansulfonová, benzensulfonová, sorbinová, pikrová, benzoová, skořicová a podobně.

Zvláštní výhodnou skupinu solí tvoří adiční soli, přijatelné z farmaceutického hlediska. Pod tímto pojmem se rozumí soli, které nejsou nežádoucím způsobem toxické pro teplokrevné živočichy.

Antibiotikum A-4696G stejně jako celý komplex tohoto antibiotika a jeho jednotlivé faktory podléhá hydrolýze v případě, že se zahřívá 70 minut na teplotu varu pod zpětným chladičem v 5% kyselině chlorovodíkové, takže vzniká pseudoaglykon, který je možno znázornit následujícím strukturním vzorcem:



Svrchu uvedený pseudoaglykon se při hydrolýze z reakční směsi vysráží.

Jak je zřejmé ze svrchu uvedeného vzorce, obsahuje pseudoaglykon šest fenolových hydroxyskupin a volnou aminoskupinu kromě aminoskupiny na aminocukru, kterým je ristosamin.

Stejně jako v případě dalších faktorů tohoto antibiotika obsahuje faktor G neutrální cukry, vázané na pseudoaglykonové jádro, přes jednu nebo větší počet fenylových skupin. Právě tyto cukry je možno odstranit hydrolyzou faktoru G v kyselém prostředí.

Z neutrálních cukrů, které byly identifikovány v hydrolyzátu komplexu celého antibiotika je možno uvést monózu, glukózu a rhamnózu. Faktor G se od ostatních faktorů zřejmě liší typem a počtem neutrálních cukrů, vázaných na jádro a také místem, v němž jsou tyto cukry vázány. V průběhu hydrolyzy se faktor G chová podobně jako faktory B₃ a C_{1a}.

Faktor G je možno odlišit od známého faktoru A a od faktorů, popsanych v US patentové přihlášce č. 217 962 svým chováním při vysokotlaké kapalinové chromatografii. Dále jsou uvedeny retenční hodnoty K' pro některé faktory antibiotika A-4696 při použití vysokotlaké kapalinové chromatografie v reverzní fázi C₁₈ (Waters Assoc. μ Bondapak C₁₈) při teplotě místnosti a při použití 2% vodného roztoku kyseliny octové a acetonitrilu v objemovém poměru 90:10 a 2% vodného roztoku kyseliny octové a acetonitrilu v objemovém poměru 70:30 jako rozpouštědla.

A-4696 faktor	K'
A	1,60
B ₁	1,99
B ₂	3,84
B ₃	2,50
C _{1a}	2,92
C ₃	4,23
E ₁	0,38
G	4,42

Mikroorganismus

Nový mikroorganismus, při jehož pěstování se získává svrchu uvedené antibiotikum byl získán mutacemi pomocí nitroseguanidinu z kmene *Actinoplanes missouriensis* ATCC 23342, to znamená z kmene, který produkuje komplex antibiotika A-4696, popsáný v US patentu číslo 3 952 095. Nový mikroorganismus produkuje faktor G jako hlavní faktor v množství přibližně 30 % celkové produkce antibiotika. Současně jsou produkovány další faktory antibiotika A-4696.

Nový mikroorganismus byl při stanovení svých vlastností srovnáván s původním kmenem ATCC 23342. Obě kultury produkují podobné substráty a primární mycelia. Sekundární mycelium nebo mycelium na vzduchu se netvoří. Nebylo možno pozorovat sporangia. Bylo užito třináct druhů živných prostředí, jejichž podkladem jsou agarové plotny a mimoto i pyl rostlin Liquidambar, Pinus a Passiflora ke sledování případné tvorby sporangí. V žádném případě nebylo možno světelným mikroskopem ani elektronovým mikroskopem tvorbu sporangí pozorovat.

Dříve byla pozorována sporangia v kultuře ATCC 23342. Sporangia popsal Dr. John N. Couch z University of North Carolina. Šlo o malé útvary o velikosti 4 až 11 μ m, přibližně kulovité, zřídka přesně kulovité, obvykle s nepravidelnou stěnou, to znamená, že stěna byla na řezu nepravidelně zvlněná.

Zralé spory byly uspořádány ve sporangiu ve formě jedné nebo většího počtu nezřetelných spirál. Sporangia jsou schopna bobtnání zejména v materiálu mezi sporami, přičemž se sporangium zvětší a nabyde téměř hladkého kulovitěho tvaru. Přitom se uvolní spory, které jsou pohyblivé, velikosti 1 až 1,5 μ m v průměru a mají přibližně kulovitý tvar.

Kultura ATCC 23342 má buněčnou stěnu typu II, ve stěně je možno prokázat kyselinu meso-2,6-diaminopimelovou i kyselinu hydroxydiaminopimelovou Becker B. a další, "Rapid Differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by Paper Chromatography of Whole Cell Hydrolysates", Appl. Microbiol. 11: 421 až 423 (1964) .

Kultura ATCC 23342 se od kultury ATCC 31681 liší hlavně pigmentací primárního mycelia. Kultura ATCC 23342 má mycelium oranžově zbarvené a to mírně až hnědooranžové do sytě oranžového až žlutooranžového zbarvení v závislosti na živném prostředí. Kultura ATCC 31681 nemá žádné vyjádřené zbarvení. Mycelium je obvykle žlutavě šedé. Tato kultura také neprodukuje žádný charakteristický rozpustný pigment.

Kultura ATCC 23342 produkuje červenavě hnědý rozpustný pigment na prostředí ISP 7 a na agaru s protlakem z rajčat a ovesnou moukou (TPC).

Melibióza se využívá kulturou ATCC 23342, avšak nikoli kulturou ATCC 31681.

Při stanovení vlastností kultur bylo užito metod, doporučených International Streptomyces Project (ISP) pro sledování vlastností *Streptomyces* species E. B. Shirling, a D. Gottlieb, "Methods of Characterisation of *Streptomyces* Species. Internal. Journal of Systematic Bacteriology, 16 (3:313 až 340 (1966) , byla rovněž provedena řada doplňkových zkoušek.

Kmen *Actinoplanes missouriensis* ATCC 31681, produkující antibiotikum A-4696G je možno získat v čisté kultuře bez přítomnosti ostatních kmenů tak, že se mikroorganismus pěstuje na šikmém agaru, agarových plotnách nebo ve sterilním vodném živném prostředí. Nový kmen, získaný mutací je možno využít pro výrobu antibiotika A-4696G.

Svrchu uvedený kmen *Actinoplanes missouriensis* ATCC 31681 produkuje faktor G a další látky s antibiotickým účinkem, přičemž faktor G tvoří přibližně 30 % antibiotik. Nový kmen může růst na celé řadě živných prostředí, která obsahují využitelné zdroje uhlíku, dusíku a anorganických solí. Vhodnými zdroji uhlíku jsou například uhlohydráty jako škrob, glukóza, dextrin a podobně. Glycerol je rovněž mikroorganismem využíván jako zdroj uhlíku.

Výhodným a levným zdrojem uhlíku je melasa, avšak výhodnější je škrob. Ze zdrojů dusíku je možno uvést aminokyseliny, peptony a kvasinky. Je také možno užít oleje, například sójový olej nebo arašídový olej jako zdroje dusíku. Nejvýhodnějším zdrojem dusíku jsou kvasinky, obvykle extrakt z kvasnic.

Stejně jako v případě dalších mikroorganismů, produkujících antibiotika se včlenění do živného prostředí anorganické soli. Anorganické soli, které padají v úvahu jsou ty látky, které jsou zdrojem iontů sodíku, draslíku nebo vápníku a iontů amonných, fosforečnanových, chloridových, síranových a podobně. Je také možno do živného prostředí přidávat stopové prvky, nutné pro růst mikroorganismů, a to jednotlivě nebo spolu s dalšími živinami.

Malé množství stopových prvků, dostatečná k uvedenému účelu se obvykle vyskytují jako nečistoty v ostatních složkách živného prostředí.

K dosažení vyšší produkce faktoru G v živném prostředí je možno do tohoto prostředí přidávat také zdroje růstových faktorů, například lihovarnické výpalky a extrakt z kvasnic.

Nový kmen, produkující faktor G je možno pěstovat v širokém rozmezí pH. Pro maximální produkci antibiotika, je však výhodné udržovat pH v rozmezí 6 až 8,0, s výhodou v rozmezí 6,5 až 7. V průběhu růstu mikroorganismu se pH živného prostředí obvykle zvyšuje z výhodného rozmezí na pH 7,0 až 7,5.

Malé množství antibiotika je možné získat při pěstování uvedeného kmene v třepacích lahvích o objemu 250 až 2 000 ml. Pro produkci antibiotika ve velkém množství se užívá

fermentorů o přibližném objemu 10 000 až 200 000 litrů. Nejvýhodnější je pěstování v submersní kultuře za aerobních podmínek, zejména v případě, že je nutno získat velké množství faktoru G. Stejně jako při produkci jiných látek se v tomto případě užívá velkých sterilních fermentorů s obsahem živného prostředí, které se očkuje dostatečným množstvím očkovacího materiálu pro růst a produkci antibiotika v požadované době od naočkování.

Očkovací materiál pro velké tanky se získá tak, že se mikroorganismus nejprve pěstuje na šikmém agaru, odkud se přenesse do třepacích lahví s obsahem živného prostředí. Vegetativní prostředí v plném růstu se pak z třepací lahve přenesse do většího objemu, který tvoří mezistupeň mezi třepací lahví a reprodukčním tankem. Jakmile růst v tomto mezistupni je optimální přenesse se obsah do největšího tanku.

Kmen *A. missouriensis* ATCC 31681 je možno pěstovat ve fermentačním prostředí při teplotách 20 až 40 °C. Výhodná teplota pro maximální produkci faktoru G je přibližně 30 °C.

V průběhu fermentace nového kmene se živným prostředím nechá procházet sterilní vzduch a současně se živné prostředí míchá. Přivádí se například 0,1 až 1,0 objemu vzduchu na 1 objem živného prostředí za minutu, výhodná rychlost provzdušňování živného prostředí však je alespoň 0,5 objemu vzduchu na 1 objem živného prostředí za minutu.

Při svrchu uvedených fermentačních podmínkách obvykle dochází k maximální produkci faktoru G v průběhu 4 až 6 dnů. Průběh fermentace je možno sledovat tak, že se odebírají vzorky, jejichž antibiotická účinnost se sleduje. Vhodným mikroorganismem pro toto použití je *Bacillus subtilis*. Zkoušky se provádí standardním způsobem použitím ploten s papírovými kotouči nebo miskami na agarových živných prostředcích, naočkovaných zkoumaným mikroorganismem.

Při izolaci faktoru G do fermentačního prostředí se s výhodou postupuje tak, že se živné prostředí chromatografuje na pryskyřici bez funkčních skupin. Pro tento účel je vhodná například pryskyřice Dision HP 20 (Mitsubishi). Dalšími podobnými pryskyřicemi bez funkčních skupin jsou například Ambertlite XAD-4 (Rohm a Haas Co.) a Duolite SES 861 (Diamond Shamrock), tyto pryskyřice mohou být rovněž užity.

Izolace faktoru G se obvykle provádí tak, že se živné prostředí zředí organickým rozpouštědlem, mísitelným s vodou, například acetonem a pH tohoto zředěného fermentačního prostředí se sníží na 1,5 až 2,0, načež se okyselené prostředí zfiltruje k oddělení mycelia a dalšího nerozpustného podílu. K urychlení filtrace je možno použít pomocných prostředků, například infusoriové hlínky nebo dalších běžně dodávaných pomocných prostředků pro filtraci.

Nerozpustný podíl je možno oddělit také odstředěním. Prostedí se pak upraví na pH 3 až 4 a odpaří k odstranění organického rozpouštědla. Prostedí se pak nechá projít pryskyřicí bez funkčních skupin a antibiotikum se vymývá směsí vody a organického rozpouštědla, například směsí vody a methanolu, vody a ethanolu nebo vody a acetonu.

Obvykle tvoří organické rozpouštědlo 20 až 50 objemových % směsi. Frakce eluátu s obsahem antibiotika se zahustí na malý objem a antibiotikum se vysráží z koncentráту ve volné formě po úpravě pH na 6,5 až 7.

Je také možno postupovat tak, že se po skončení fermentace faktor G izoluje z fermentačního prostředí běžnými izolačními postupy například adsorpcí na vhodnou iontoměničovou pryskyřici s následným chromatografickým dělením. Vhodné pryskyřice jsou například kationtoměničová pryskyřice s malým počtem příčných můstek, například Amberlite IR-116.

Jak již bylo uvedeno, antibiotikum A-4696 faktor G je zásaditá látka, která obsahuje dvě zásadité aminoskupiny. Faktor G proto tvoří adiční soli s anorganickými a organickými

kyselinami. Soli faktoru G se připravují běžným způsobem, například dihydrochlorid se připravuje tak, že se volná látka uvede v reakci s kyselinou chlorovodíkovou ve směsi vody a methanolu. Dihydrochlorid se z roztoku vysráží, oddělí se filtrací a usuší. Sulfát je možno získat tak, že se kyselina sírová přidá k roztoku faktoru G ve směsi vody a methanolu nebo ve směsi vody a ethanolu.

Faktor G je možno užít ke zrychlení hmotnostních přírůstků u kuřat tak, že se tento faktor včlení do krmiva nebo pitné vody pro kuřata. Faktor G je možno včlenit do krmiva v koncentraci 2,5 až 100 ppm, v tomto případě zvyšuje přírůstky a zlepšuje využití krmiva ve srovnání s kontrolními zvířaty. Při podávání do pitné vody se obvykle užívá sůl faktoru G, přijatelná z farmaceutického hlediska. Vhodnou sůl antibiotika A-4696G pro toto podání je dihydrochlorid. Koncentrace antibiotika A-4696G nebo jeho soli v pitné vodě se obvykle užívá při hladinách 1,5 až 50 $\mu\text{g/ml}$, s výhodou 10 až 20 $\mu\text{g/ml}$. Je tedy možno urychlit růst kuřat tak, že se kuřatům podává účinné množství růstového faktoru G antibiotika A-4696 nebo některá z jeho solí, přijatelných z farmaceutického hlediska.

Jak již bylo uvedeno, je možno faktor G včlenit do krmiva nebo pitné vody kuřat. Kuřatům je možno podávat krmivo s obsahem antibiotika A-4696G v celém průběhu růstu až do dosažení maximálního přírůstku.

Antibiotikum A-4696G je možno včlenit do krmiva pro kuřata. K tomuto účelu je možno užít izolovaný a v podstatě čistý faktor A-4696G. Vysoce hospodárná a pohodlná forma podávání faktoru G pro uvedené použití však spočívá v tom, že se usuší celé fermentační prostředí, čímž se získá faktor G ve směsi s myceliem. Tato směs s obsahem mycelia a antibiotika A-4696G může být analyzována na obsah faktoru G, aby bylo možno do krmiva pro kuřata přidat příslušné množství tohoto faktoru.

Tímto způsobem je rovněž možno zužitkovat mycelium s příměsí faktoru G jako krmiva, doplňující sacharidy a aminokyseliny do denní dávky kuřat.

Směs mycelia a antibiotika A-4696G je možno získat tak, že se oddělí mycelium od živného prostředí a po odstranění faktoru G živného prostředí svrchu uvedeným způsobem se zahustí eluáty z chromatografických sloupců s obsahem faktoru G a koncentráty se smísí s odděleným myceliem před jeho usušením.

Antibiotikum A-4696 faktor G a jeho soli, přijatelné z farmaceutického hlediska jsou účinné látky, podporující růst také u přežvýkavců například krav, koz a ovcí. Účinnost využití chlorhydrátů u přežvýkavců se zvyšuje v tom případě, že je mikrobiální flóra bacheru podporována k tvorbě sloučenin typu propionátu a nikoli typu acétátu nebo butyrátu při štěpení alifatických kyselin, jak bylo uvedeno v publikaci Church a další, "Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants", sv. 2, str. 622 až 625 (1971). Antibiotikum A-4696G ve volné formě nebo s výhodou ve formě soli, přijatelné z farmaceutického hlediska podporuje tvorbu propionátu ve srovnání s tvorbou acétátů a butyrátů v bacherové šťávě.

Například při pokusech prováděných s bacherovou šťávou ve fermentačních lahvích, v nichž je možno napravit činnost bacheru podporuje antibiotikum A-4696 tvorbu propionátu ve srovnání se všemi ostatními alifatickými kyselinami.

Pokusy byly prováděny následujícím způsobem:

K pokusům bylo užito plynotěsných lahví, opatřených vstupním otvorem pro kapaliny a pevné látky a výstupním otvorem pro plyny, které byly spojeny s vaky pro shromažďování fermentačních plynů.

Objemy kapaliny v lahvích byly udržovány na 500 ml vedením, které směřovalo k odběrné nádobě. Obsah baněk byl v průběhu zkoušek stále míchán magnetickým míchadlem. Teplota v bankách byla udržována v rozmezí 38 až 40 °C.

Do každé baňky bylo přidáno 500 ml šťávy z bachoru, odebrané od býků s píštělí, býkům byla podávána tatáž potrava, jaká byla použita ve zkoumané kapalině. Baňky byly zataveny a byly připojeny vaky pro odběr plynu. Do baňek byl přidáván kapalný pufr o pH 6,8 až 7,0 následujícího složení rychlostí přibližně 1 litr za den.

Složka	g/litr
hydrogenfosforečnan sodný	2,2
chlorid hořečnatý	0,036
hydrogenuhlíčan sodný	5,9
chlorid draselný	0,34
chlorid sodný	0,28
močovina	1,0
chlorid vápenatý	0,024

Dvakrát denně bylo do každé baňky přidáno 10 g krmiva. Po každém přidání byl uzavřen výstup pro plyn a baňka byla promyta kysličníkem uhličitým. Složení krmiva bylo 50 % sena z vojtěšky a 50 % krmiva následujícího složení:

Složka	hmotnostní %
hrubě mletá kukuřice	40,85
mleté kukuřičné stvoly	35
sójová mouka (50 % proteinu)	8,1
mouka z vojtěšky	4
melasa	10
močovina	0,65
hydrogenfosforečnan vápenatý	0,6
uhlíčan vápenatý	0,3
chlorid sodný	0,3
směs vitamínu A a D ₂	0,07
doplňkové krmivo s vitamínem E	0,05
stopové prvky	0,04

Býci, jímž byla odebírána bachorová šťáva byli krmeni tímtož krmivem.

Každý den v průběhu zkoušek byla analyzována kapalina i plyn. Fermentace probíhá 4 dny před přidáním antibiotika do krmiva. Po 4 dnech a po dosažení relativně stálého složení odebíraného plynu a kapaliny bylo přidáváno do krmiva antibiotikum A-4696G a fermentace pak byla prováděna ještě 7 dní.

Z každé baňky byla odebírána kapalina, v níž byl plynovou chromatografií stanoven obsah acetátu, propionátu a butyrátu. Údaje získané při přidávání antibiotika A-4696G jsou uvedeny v následující tabulce 5.

T a b u l k a 5

Vliv antibiotika A-4696G na složení šťávy z bachoru

Skupina	Dávka ¹⁾ μg/ml	Tvorba VFA ²⁾			Celkem/VFA	Produkce C ₃ v mol. %
		C ₂	C ₃	C ₄		
kontrola	0	43,6	15,2	5,4	64,2	23,7
antibiotikum A-4696G ³⁾	4	39,0	21,4	3,3	63,7	33,6

1) Koncentrace ve zkoumaném roztoku

2) Těkavé alifatické kyseliny v milimolech/den

3) A-4696G ve volné formě

Důležitým využitím vynálezu je možno zvýšit využití krmiva u přežvýkavců s vyvinutou bachorovou funkcí tak, že se těmto zvířatům podává perorálně takové množství antibiotika A-4696G, které zvýší produkci propionátu.

Podle vynálezu se postupuje tak, že se podává perorálně zvířatům alespoň takové množství antibiotika A-4696G, aby se zvýšila produkce propionátu v bachoru. Toto množství se pohybuje přibližně v rozmezí 0,1 mg/kg tělesné hmotnosti denně až 5 mg/kg denně. Výhodné rozmezí je 0,25 až 3 mg/kg/den.

Antibiotikum A-4696 a jeho soli, přijatelné z farmaceutického hlediska například síran, hydrochlorid nebo fosforečnan je možno podávat ve formě doplňkového krmiva, ve formě krmiva nebo ve formě bloků, popřípadě ve formě tablet, z nichž se antibiotikum pomalu uvolňuje.

Tento poslední způsob je nejvýhodnější pro zvířata, která se pasou. Tablety uvedeného typu je možno připravit s obsahem polymeru, který zajišťuje pomalé uvolňování antibiotika A-4696 po dobu několika dní.

Tablety musí mít dostatečně vysokou specifickou hmotnost, aby se nedostávalo zažívacím ústrojím dále než do bachoru. Tuto vysokou specifickou hmotnost je možno dosáhnout například přidáním částic kovu.

Minerální bloky s obsahem antibiotika A-4696G jsou rovněž velmi vhodným způsobem podávání tohoto antibiotika zvířatům na pastvě. Tyto bloky obsahují ve slisovaném stavu soli, zejména anorganické a další živné látky jako fosforečnany, uhličitany, vápenaté soli, stopové prvky, například zinek, mangan a podobně, vitamíny, steroidy a popřípadě další složky. Antibiotikum A-4696G je možno do těchto bloků včlenit v koncentraci 0,05 až 5 %.

Dalším výhodným způsobem podávání antibiotika A-4696G je forma doplňkového krmiva. Antibiotikum A-4696G a jeho soli, přijatelné z farmaceutického hlediska je možno zpracovávat na celou řadu krmiv, která jsou nová a rovněž spadají do oboru vynálezu.

Krmiva pro hospodářská zvířata se obvykle připravují v několika stupních. Nejprve se účinná látka smísí s inertními složkami na předběžnou směs, která se dodává od původního výrobce do podniků, které připravují hotová krmiva pro hospodářská zvířata.

Tyto předběžné směsi mohou být kapalné nebo pevné a mohou obsahovat 1 až 90 % účinné látky. Povaha inertních složek v předběžném krmivu není kritická, může jít o jakýkoli

běžně užívaný nosič, přijatelný z fyziologického hlediska. Kapalnými nosiči mohou být například glykoly, jako polyethylenglykoly a různé molekulové hmotnosti a propylenglykol, inertní oleje včetně rostlinných olejů a čištěných minerálních olejů a alkoholy, přijatelné z fyziologického hlediska, například ethanol.

Pevné směsi mohou obsahovat nosiče jako vermikulit, infusoriovou hlinku, jiné hlinky přijatelné z fyziologického hlediska, například atapulgite nebo morillonit a granulované nebo práškované součásti krmiva jako hrubě mletou kukuřici, sójovou mouku, vojtěškovou mouku, rýžové plevy, drcenou kukuřici, drcenou pšenici nebo oves a další druhy odpadových materiálů při zpracování zrní. Tyto složky pevných předběžných krmivových směsí se často granulují, zpracovávají na pelety nebo se zpracovávají jinak k zajištění homogenity krmiva.

Dále budou uvedeny typické příklady předběžných krmiv, které obsahují antibiotika A-4696G, vyrobené způsobem podle vynálezu:

I.

mletý oves	84 %
propylenglykol	2
lignin	3
A-4696G dihydrochlorid	11

II.

žlutá kukuřice	24 %
mletá kukuřice	25
minerální olej	1
A-4696G sulfát	50

III.

sójová mouka	10 %
A-4696G fosfát	90

IV.

polyethylenglykol	90 %
A-4696G dihydrochlorid	9
polyoxyethylenester	1

V.

vermikulit	33 %
olej z bavlníkových semen	2
A-4696G	65

VI.

rýžové plevy	22,5 %
melasa	2,5
A-4696G sulfát	75

VII.

minerální olej	90 %
polyglykterolester	5
A-4696G	5

VIII.

mletá kukuřice	74 %
sójový olej	1
A-4696G dihydrochlorid	25

Výhodná předběžná krmiva jsou taková, která obsahují 100 g antibiotika A-4696G nebo jeho soli v 1 kg až 200 g antibiotika A-4696G nebo jeho soli v 1 kg předběžné směsi.

Druhým stupněm výroby krmiva pro hospodářská zvířata je doplňkové krmivo nebo koncentrát. Taková doplňková krmiva obsahují výše uvedenou sloučeninu, ve směsi s dalšími živinami, například anorganickými látkami, solemi, stopovými prvky a vitamíny.

Doplňkové krmivo se často vyrábí tak, že se předběžná směs mísí a ředí s dalšími složkami a většinou se vyrábí ve velkém množství. Doplňkové krmivo pak může být užito při výrobě výsledného krmiva s obsahem antibiotika A-4696G nebo je možno jej prostě smísit s krmivem bez obsahu tohoto antibiotika při výsledném dávkování krmiva.

Koncentrace antibiotika A-4696G v doplňkovém krmivu se může měnit v širokém rozmezí v závislosti na množství doplňkového krmiva, které má být podáno jednotlivým zvířatům. Obecně se může koncentrace v doplňkovém krmivu pohybovat v rozmezí 0,01 až 1 %, s výhodou 0,02 až 0,5 %. Dále budou uvedeny příklady doplňkových krmiv s obsahem antibiotika vyrobených způsobem podle vynálezu.

I.

mleté kukuřičné palice	38,5 %
sójová mouka	25,0
mletá kukuřice	20,0
mletý oves	10,0
melasa	2,5
sůl	0,4
směs vitamínů	1,1
živočišný tuk	1,5
A-4696G fosfát	1,0

II.

sójová mouka	64,29 %
biuret	10,0
hydrogenfosforečnan vápenatý	4,2
tripolyfosfát sodný	2,1
síra	0,4
melasa	6,0
sůl	12,8
směs anorganických stopových prvků	0,2
A-4696G	0,01

III.

sójová mouka	49,59 %
vojtěšková mouka	24,8
močovina	12,4
hydrogenfosforečnan vápenatý	2,5
mletý vápenec	7,4
sůl	2,5
směs vitamínů	0,8
A-4696G sulfát	0,01

IV.

sójová mouka	89,55 %
hydrogenfosforečnan vápenatý	10,0
A-4696G dihydrochlorid	0,45

V.

sójová mouka	10,75 %
močovina	20,0
hydrogenfosforečnan vápenatý	16,0
uhličitan vápenatý	24,0
sůl	20,0
hydrogenuhličitan sodný	2,0
směs stopových prvků a vitamínů	7,2
A-4696G	0,05

Krmiva pro přežvýkavce jsou obvykle a s výhodou založena na obilovinách vzhledem k potřebám těchto zvířat. Běžné krmivo pro přežvýkavce obsahující pšenici, oves, ječmen, kukuřici a podobně se mísí s výše uvedenými sloučeninami, běžným způsobem, tak jak tomu je při přidávání dalších účinných látek do krmiv.

Krmivo se tedy skládá obvykle ze svrchu uvedených základních součástí a doplňků, jako jsou vitamíny, stopové prvky, anorganické soli a další důležité živné složky, které zajišťují správnou výživu přežvýkavců. Krmivo by mělo obsahovat přibližně 5 ppm až 500 ppm antibiotika A-4696G nebo jeho soli, s výhodou 10 až 250 ppm tohoto antibiotika. Dále budou uvedena typická krmiva s obsahem antibiotika nebo jeho solí.

I.

řezaná vojtěška	54,88 %
proso	36,20
sójová mouka	4,10
směs močoviny a obilí, 70 % bílkoviny	3,60
hydrogenfosforečnan vápenatý	0,90
sůl s obsahem stopových prvků	0,23
vitamíny	0,09
A-4696G	5 ppm

II.

mleté proso	60,0 %
mouka z vojtěšky	15,0
slupky z bavlníkových semen	15,0
mouka z bavlníkových semen	8,5

sůl	1,0
mletý vápenec	0,5
A-4696G fosfát	250 ppm

III.

pšenice	44,54 %
kukuřičné palice	45,00
melasa z třtiny	3,00
sójová mouka	6,40
hydrogenfosforečnan vápenatý	0,65
vápenec	0,38
stopové prvky	0,03
A-4696G	50 ppm

IV.

mleté seno z jetele	15 %
mleté seno z vojtěšky	15
drcená kukuřice	50
plnotučná sójová mouka	10
melasa	9
směs stopových prvků, vitamínů a soli	1
A-4696G sulfát	100 ppm

Antibiotikum A-4696 faktor G je možno užít také jako látky, urychlující růst drůbeže a vepřů. K tomuto účelu se antibiotikum A-4696G nebo některá z jeho solí, přijatelných z farmaceutického hlediska podává svrchu uvedeným zvířatům v krmivu nebo v pitné vodě. S výhodou se podává dihydrochlorid antibiotika A-4696G nebo jiná ve vodě rozpustná sůl v pitné vodě.

Vynález bude osvětlen následujícími příklady:

P ř í k l a d 1

Způsob výroby antibiotika A-4696G

Pro naočkování kmenem, produkujícím antibiotikum A-4696G byl připraven šikmý živný agar následujícího složení:

Složka	Hmotnostní %
cerelóza	0,5
dextrin z brambor	2,0
mouka nutriosy	1,5
extrakt z kvasnic	0,25
uhličitan vápenatý	0,1
agar	2,0

Živný agar se naočkuje kmenem ATCC 31681, produkujícím antibiotikum A-4696G a pak se inkubuje 6 dní při teplotě 30 °C. Po inkubaci se mycelium na šikmém agaru překryje sterilní destilovanou vodou a uvolní sterilní tyčinkou nebo kličkou za vzniku vodné suspenze mycelia.

Tato vodná suspenze se užije k naočkování 100 ml sterilního vegetativního živného prostředí, které má stejné složení jako svrchu uvedený šikmý agar. Takto naočkované živné prostředí se inkubuje 48 hodin při teplotě 30 °C.

V průběhu inkubace se vegetativní živné prostředí míchá na rotační třepačce při 250 otáčkách za minutu. Po skončení inkubaci se 10 ml kultury odebere a užije jako očkovací materiál pro další stupeň, v němž má živné prostředí následující složení.

Složka	Hmotnostní %
cerelóza	0,5
kvasnice	0,25
mouka Nutriosy	1,5
kukuřičný škrob	2,0
uhličitan vápenatý	0,1
protipěšivé činidlo (Sag 471) ^x	0,05

^x Sag 471 = protipěšivé činidlo silikonového typu (Union Carbide)

Toto živné prostředí se inkubuje 24 hodin při teplotě 30 °C za stálého míchání na rotační třepačce při 250 otáčkách za minutu. Po skončení inkubaci se toto prostředí užije k naočkování sterilního produkčního prostředí pro antibiotikum A-4696G následujícího složení.

Složka	Hmotnostní %
cerelóza	2,5
kvasnice	2,0
uhličitan vápenatý	0,2
síran amonný	0,025
hydrogenfosforečnan draselný	0,05
glycerin	1,5
melasa	1,5
kukuřičný škrob	3,5
protipěšivé činidlo (Sag 471)	0,03

Fermentace se provádí 143 hodin při teplotě 30 °C za stálého míchání a provzdušňování sterilním vzduchem rychlostí 1/2 objemu vzduchu na 1 objem živného prostředí za minutu. V průběhu fermentace se zvýší pH živného prostředí z počátečního pH 6,5 na pH přibližně 8,0.

Část (30 litrů) fermentačního prostředí se zředí 30 litry acetonu a pH se upraví na 1,8 přidáním kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 6 N. Okyselené živné prostředí se zfiltruje při použití pomocného prostředku pro filtraci a nerozpustný podíl se promyje na filtru vodou.

Filtrát se upraví na pH 3,5 přidáním 150 ml hydroxidu sodného o koncentraci 50 % a filtrát se zahustí ve vakuu na objem 29 litrů. Pak se pH znovu upraví z 2,2 na 3,1 hydroxidem sodným a směs se znovu zfiltruje k odstranění nerozpustného podílu.

Antibiotikum se vymývá deionizovanou vodou, rychlost průtoku je 30 ml/minutu. Eluce se sleduje chromatografií na tenké vrstvě. Frakce, s obsahem antibiotika A-4696G se zahustí při teplotě 35 °C a tlaku 400 Pa a pak se lyofilizuje.

Usušené odbarvené antibiotikum A-4696G se pak rozpustí v deionizované vodě. Výsledný vodný roztok se zfiltruje a nanese na vrchol chromatografického sloupce s obsahem polyamidu (Machery a Nagel SC6). Sloupec se vymývá deionizovanou vodou, Eluce se sleduje ultrafialovým světlem a chromatografií na tenké vrstvě. Účinná frakce se slíjí a lyofilizují. Další čištění se provádí opakovanou chromatografií.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Krmivo pro hospodářská zvířata, zvláště přežvýkavce a drůbež, resp. předsměs k jeho vytvoření, vyznačující se tím, že obsahuje 0,01 až 90 hmotnostních % antibiotika A-4696G které je glykopeptidem se dvěma aminoskupinami zásadité povahy, ve formě dihydrochloridu jde o bílou krystalickou sloučeninu, v podstatě rozpustnou ve vodě a nerozpustnou v organických rozpouštědlech jako methylethanolu, acetonu, chloroformu a benzenu,

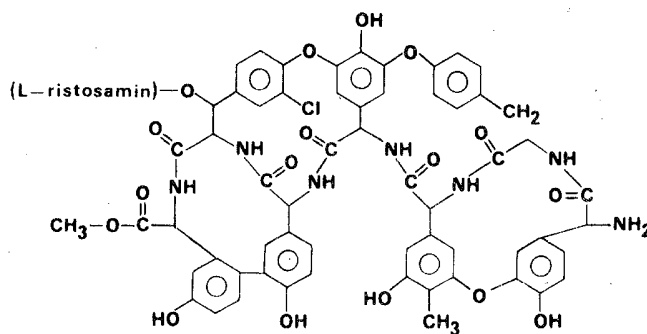
s přibližným procentuálním prvkovým složením 52,90 % uhlíku, 4,29 % vodíku, 6,39 % dusíku, 30,96 % kyslíku, a 5,46 % chloru,

s absorpčním maximem v ultrafialovém světle v bromidu draselném při 3384 (široké), 2924 (slabé), 1730 (hrb), 1659 (intenzivní), 1616 (slabé), 1590 (slabé), 1504 (intenzivní), 1488 (hrb), 1427 (středně silné), 1289 (slabé), 1226 (dublet), 1214 (dublet), 1179 (slabé), 1119 (slabé), 1060 (intenzivní), 1028 (slabé), 1015 (hrb), 986 (slabé), 899 (velmi slabé), 881 (velmi slabé), 815 (slabé), 801 (hrb), 769 (hrb), 751 (hrb) a 711 (slabé) cm^{-1} ,

s absorpčním maximem v ultrafialovém světle ve vodě při 279 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 53$);

s volnou formou, kterou je možno titrovat kontinuálně v rozmezí pH 3,5 až 13,5 při elektrometrické titraci v 66% vodném dimethylformamidu,

při hydrolýze po dobu 70 minut v 5% vodném roztoku kyseliny chlorovodíkové při varu pod zpětným chladičem se vytváří pseudoaglykon vzorce



nebo jeho adiční soli s kyselinou, přijatelné z farmaceutického hlediska.

Filtrát s obsahem antibiotika se nechá projít sloupcem o průměru 7,5 cm s obsahem 5 litrů pryskyřice bez funkčních skupin na styrendivinybenzenovém podkladu (Mitsubishi Dianion HP-20) po předběžném zpracování methyllalkoholem a promytí vodou.

Rychlost průtoku je 250 ml za minutu. Po adsorpci antibiotika na pryskyřici se sloupec promyje 5 litry vody a pak se postupně vymývá 2 l litry vodného methyllalkoholu o koncentraci 20 %, 15 litry 50% vodného methyllalkoholu a 15 litry 50% vodného acetonu. Odebírají se frakce o objemu 4 litry. Frakce 8, 9 a 10 obsahuje většinu antibiotika a mimoto je prostá větších nečistot.

Frakce 8, 9 a 10 se slíjí a odpaří na objem 6 litrů ve vakuu. Po úpravě koncentráту na pH 6,8 přidáním vodného roztoku hydroxidu sodného se koncentrát vlije do 60 litrů isopropylalkoholu. Antibiotikum A-4696G se z této směsi vysráží, oddělí se filtrací a usuší. Tímto způsobem se získá 54,2 g antibiotika A-4696G v podstatě v čisté formě.

P ř í k l a d 2

Výroba antibiotika A-4696G ve formě dihydrochloridu

Antibiotikum A-4696G ve volné formě se rozpustí ve vodném methanolu a získaný roztok se zředí kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci 1 N. Po promíchání se okyselený roztok může zředit acetonem, čímž se vysráží antibiotikum A-4696G ve formě dihydrochloridu.

P ř í k l a d 3

Další možný způsob výroby antibiotika A-4696G

Fermentační prostředí, připravené stejným způsobem jako v příkladu 1 se zfiltruje po přidání 5 % (hmotnostní/objemová %) pomocného prostředku pro filtraci (Celite 545). Filtrační koláč se znovu uvede v suspenzi ve stejném objemu deionizované vody a pH takto získané vodné suspenze se upraví na hodnotu 10,5 přidáním vodného roztoku hydroxidu sodného. Pevný podíl se ze suspenze oddělí filtrací a promyje se vodou. Filtrát se slíje s vodou, užitou k promývání a takto získaný výsledný roztok se okyselí přidáním 20% hmotnostní/objemová % vodného roztoku kyseliny sírové na pH 4,5.

Okyselený roztok se vyčeří filtrací při použití 1 % pomocného prostředku pro filtraci (Celit 545).

Čirý roztok se nechá projít sloupcem, který obsahuje iontoměničovou pryskyřici Amberlite IR-116 (Na⁺ forma) a sloupec se promyje deionizovanou vodou. Pak se iontoměnič vyjme ze sloupce a po jednotlivých podílech se vymývá při pH 10,5 vodným roztokem hydroxidu sodného.

Získaný eluát se neutralizuje na pH 7 přidáním 20 % (hmotnostní/objemová %) vodného roztoku kyseliny sírové, načež se promyje třemi podíly deionizované vody. Voda, užítá k promývání se neutralizuje a slíje s neutralizovaným eluátem. Výsledný roztok se koncentruje a pak se lyofilizuje.

Takto získaný surový komplex se za energického míchání pomalu přidává k deionizované vodě. Výsledná suspenze se 20 minut míchá a pak se neutralizuje na pH 7 přidáváním 10% vodného roztoku hydroxidu amonného. Nerozpustné antibiotikum A-4696G se oddělí filtrací ve vakuu, pr myje se deionizovanou vodou a pak se lyofilizuje.

Takto získané vysušené antibiotikum A-4696G, zbavené solí se uvede v suspenzi v deionizované vodě a pH suspenze se upraví na 2,7 přidáním 3N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové. Okyselený roztok se odstřeďuje 40 minut při 2 500 otáčkách za minutu. Supernatant se slíje a nanese na vrchol sloupce s obsahem pryskyřice k odbarvení. (Duolit S761).