



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

196263
(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
A 23 K 1/17 //
C 12 P 1/06

{22} Přihlášeno 16 04 75
{21} (PV 3684-77)

{32} {31} {33} Právo přednosti od 17 01 75
(541800) Spojené státy americké

{40} Zveřejněno 29 06 79

{45} Vydáno 15 12 82

{72}
Autor vynálezu

CELMER WALTER DANIEL, NEW LONDON, CULLEN WALTER PATRICK,
EAST LYME, MOPPETT CHARLES EDWARD, MYSTIC,
ROUTIEN JOHN BRODERICK, LYME (Sp. st. a.),
SHIBAKAWA RIICHIRO, HANDA a TONE JUNSUKE, CHITA (Japonsko)

{73}
Majitel patentu

PFIZER INC., NEW YORK (Sp. st. a.)

{54} Krmná směs pro zvířata

1

Vynález se týká krmiva nebo nápoje pro zvířata nebo premixů obsahujících antibiotikum.

V literatuře zabývající se antibiotiky je rozsáhle popisován synergismus:

The Journal of Antibiotics 25, č. 6, 371 (1972); J. Chem. Soc. 19C, 1653 (1966); Bull. Soc. Chim. Belg. 68, 716 (1959); J. Amer. Chem. Soc. 82, 4414 (1960); Tetrahedron Letters 2687 (1971); J. Antibiotics, Ser. A 14 (1961); Nature 187, 598 (1960); J. Chem. Soc. 2286 (1960); Antimicrobial Agents and Chemotherapy 360 až 365 (1964); Tetrahedron Letters 4231 až 4238 (1966); Organic Mass Spectrometry, 6, 151 až 166 (1972); Tetrahedron Letters 369 až 372 (1966) a J. Chem. Soc. 190, 1669 až 1776 (1966).

Nové synergické směsi antibiotik připravené podle tohoto vynálezu se připojují k jiným — již popsaným synergickým směsím: mikamycinu, pristinamycinu, ostrogrycinu, streptograminu, P. A. 114, vernamycinu a virginiamycinu.

Vynález se týká krmné směsi (včetně nápojů a premixů) pro zvířata, obsahující obvyklé složky krmiv. Podstata vynálezu je v tom, že taková krmná směs obsahuje 10 až 100 ppm antibiotik tvořených makrocyclickými laktony 36 926 a 37 277 nebo depsipeptidem 37 952, získaných kultivací mikro-

2

organismu *Actinoplanes auraticolor* ATCC 31 011, nebo jejich směsmi.

Vlastnosti výše uvedených makrocyclických laktonů a depsipeptidu jsou podrobně popsány v popisu vynálezu čs. patentu č. 196 262 téhož přihlašovatele; tamtéž je podrobně popsán i způsob kultivační výroby zmíněných látek, který se provádí kultivací mikroorganismu *Actinoplanes auraticolor* výhodně ve vodném živném prostředí při teplotách od 28 do 36 °C. Taková kultivace poskytuje směs sloučenin, přičemž většinou složky jsou označovány jako sloučeniny 37 277 (depsipeptid) a 36 926 (makrocyclický lakton) a menšinové složky jako sloučeniny 37 932 (depsipeptid) a 35 763 (makrocyclický lakton). Tyto směsi obsahující makrocyclické laktony a depsipeptidy mohou být odděleny a získány z fermentačního živného roztoku extrakcí rozpouštědlem, protiproudovým rozdělením, sloupcovou chromatografií nebo jejich kombinací. Jednotlivé antibiotické složky mají významnou antibiotickou účinnost. Surová antibiotická směs nebo kombinace makrocyclického laktonu a čistého depsipeptidu získané ze surové směsi vykazují značnou synergickou antibiotickou účinnost. Surová antibiotická směs, čisté antibiotické složky a směsi čistých makrocyclických laktonů a depsipeptidů jsou

účinnými stimulatory růstu kuřat i vepřů.

Připojené obr. 1 až 4 znázorňují infračervená spektra sloučenin 37 277, 36 926, 35 763 a 37 932. Tato spektra slouží pro identifikaci těchto sloučenin.

Základní komponenty v antibiotických směsích produkovaných *Actinoplanes auranticolor* ATCC 31011 zahrnují různé makrocyclické laktony a depsipeptidové antibiotické komponenty. Složení těchto antibiotických směsí se mění od fermentace k fermentaci a je funkcí času, hodnoty pH, složení prostředí atd. Za podmínek uvedených v příkladech provedení jsou majoritními antibiotickými komponentami v antibiotických směsích sloučeniny 37 277 (depsipeptid) a 36 926 (makrocyclický laktón), zatímco minoritními antibiotickými složkami jsou sloučeniny 37 932 (depsipeptid) a 35 763 (makrocyclický laktón).

Sloučeniny mohou být z antibiotických směsí odděleny a získány z vyfermentované živné půdy různými postupy, jako je extrakce rozpouštědlem, Craigova protiproudá extrakce, sloupcová chromatografie, nebo kombinace těchto metod. Pro extrakci antibiotik z živné půdy jsou použitelná různá organická rozpouštědla, jako je chloroform, ethylacetát a methylisobutylketon. Extrakce rozpouštědlem se s výhodou provádí dvojnásobnou extrakcí živné půdy při pH 7, objemem rozpouštědla přibližně $\frac{1}{3}$ až $\frac{1}{2}$ objemu živné půdy, ze které je třeba získat směs antibiotik. Podle objemu živné půdy jsou pro extrakční účely použitelná extrakční zařízení, například dělicí nálevky, míchací tanky a mechanická extrakční zařízení, například odstředivky.

Výhodná metoda oddělování a regenerace složek z antibiotických směsí je následující: celá nebo vyčištěná živná půda se upraví na hodnotu pH 7 a dvakrát se extrahuje $\frac{1}{3}$ až $\frac{1}{2}$ objemu methylisobutylketonu. Extrakt se zahustí ve vakuu a koncentrát se odtuční heptanem nebo petroletherem. Odtučněný koncentrát se potom odpaří do sucha za vakua. Pevný odparek se podrobí Craigovu protiproudému dělení (6 pater) za použití směsi toluen, 5 dílů : ethanol, 2 díly : vodný fosfátový pufr o hodnotě pH 4,5, 3 díly. Po rozdělení vrstev na horní a dolní fázi v protiproudém dělicím postupu se fáze sledují tenkovrstevnou chromatografií. Oddělené frakce jsou odpařeny ve vakuu.

Pevné odparky obsahující depsipeptidy se rozpustí v chloroformu, odbarví se aktivním uhlím a po filtraci se odpaří ve vakuu do sucha. Zbytek získaný odpařením chloroformu se rozpustí v acetonu. Pevná látka vy-srážena přidáním heptanu se rozpustí v malém množství chloroformu a nanese na sloupec pufrovaného silikagelu (hodnota pH 6) ve směsi chloroform : n-propanol (99 : 1 obj/obj). Sloupec se vyvíjí ve stejné směsi rozpouštědel pod tlakem 0,55 MPa. Jednotlivé odebrané frakce se chromatografují na tenké vrstvě. Frakce obsahující rozdělené

depsipeptidy se spojí, odpaří ve vakuu a krystalují ze směsi aceton — heptan.

Frakce z protiproudé extrakce, které obsahují makrocyclické laktony, se spojí, odpaří za vakua a odparek je vyjmut ethylacetátem. Roztok se míchá se silikagelem, filtruje a rozpouštědlo se odstraní za vakua. Odparek se opět vyjme ethylacetátem a sráží přidáním hexanu. Pevné látky se rozpustí v malém množství chloroformu a chromatografují pod tlakem 0,55 MPa na sloupci pufrovaného silikagelu (hodnota pH 6) v ethylacetátu. Vyvíjející se směs má složení ethylacetát — tetrahydrofuran — hexan (80 : 20 : 20) a je nasycena vodným fosfátovým pufrém (hodnota pH 6). Jednotlivé oddělené frakce se sledují chromatograficky na tenké vrstvě. Frakce obsahující oddělené makrocyclické laktony se spojí a odpaří ve vakuu. Jednotlivé frakce jsou děleny dalším Craigovým protiproudým dělením nebo/a sloupcovou chromatografií za použití různých vyvíjecích soustav. Pečlivou identifikací v každé čistící operaci se zajišťuje, že jednotlivé makrocyclické laktony jsou dostatečně izolovány tak, že kapalně frakce mohou být odpařeny a získány čisté sloučeniny.

A. auranticolor ATCC 310100 produkuje nejméně čtyři depsipeptidy a nejméně čtyři makrocyclické laktony. Avšak primárními složkami jsou depsipeptidy: sloučeniny číslo 37 277 (majoritní) a 37 932 (minoritní), a makrocyclické laktony: sloučeniny 36 926 (majoritní) a 35 763 (minoritní).

Surové antibiotické směsi přímo získané z živné půdy a vyčištěné jednotlivé složky mají široká antibakteriální spektra. Jako mikroorganismy, které přestávají pomnožovat v přítomnosti těchto antibiotik, jsou *Salmonella typhosa*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus fecalis*, *Diplococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium diptheriae*, *Clostridium septicum*, *Bruella abortus*, *Neisseria sicca*, *Lactobacillus acidophilus* a *Pasteurella multocida*.

Antibiotika připravená podle tohoto vynálezu, buď jako surové směsi, nebo ve formě čištěných jednotlivých složek nebo jejich směsí, mohou být používány při potírání různých infekcí u lidí a zvířat. Všeobecně je u těchto antibiotik nejvhodnější podávání v denních perorálních dávkách 0,5 až 1 g, nebo v parenterálních dávkách od 100 do 500 mg v závislosti na typu a závažnosti infekce a na váze léčeného organismu.

Sloučeniny podle tohoto vynálezu mohou být podávány samotné nebo v kombinaci s farmaceuticky použitelnými vehikuly, a takto mohou být podávány v jednotlivých nebo násobných dávkách.

Tablety pro účely perorálního podávání obsahují různá plnidla, jako například citrát sodný, uhličitán vápenatý a střední fosforečnan vápenatý, a mohou být přidána

různá rozvolňovací, jako například škrob, kyselina alginová a komplexní křemičitany, společně s pojiv, jako je například polyvinylpyrrolidon, sacharóza, želatina a arabská guma. Kromě toho se často používají i kluzné látky; jako je stearat hořečnatý, sodná sůl kyseliny laurylsulfonové a mastek pro tabletovací účely. Přípravky v tuhé formě podobného typu mohou být používány jako náplně do měkkých a tvrdých želatinových kapslí; vhodnými materiály jsou laktóza a také vysokomolekulární polyethylenglykoly. Vodné suspenze nebo/a elixíry jsou vhodné pro perorální podávání; jejich základní složka může být kombinována s různými sladidly nebo chuťovými látkami, dále také s ředidly, jako je například voda, ethanol, propylenglykol, glycerol a jejich směsi.

Roztoky těchto antibiotik v sezamovém a

podzemnicovém oleji nebo ve vodném propylenglykolu mohou být používány pro parenterální podávání.

Je zajímavé, že jednotlivá antibiotika podle tohoto vynálezu vykazují antimikrobiální účinek, který je velkou měrou bakteriostatické povahy. Však surové antibiotické směsi nebo směsi čištěných depsi-peptidů a čištěných makrocyclických laktonů vykazují synergický účinek, který je převážně baktericidní povahy.

Při zkoušení majoritního makrocyclického laktonu, sloučeniny 36 926 (A) a majoritního depsi-peptidu, sloučeniny 37 277 (B) jednotlivě a ve směsi zředovací metodou ve zkumavkách proti následujícím mikroorganismům, byla zjištěna minimální inhibiční koncentrace v mikrogramech/ml/MIC:

Mikroorganismus	A	B	A + B	Surová směs
Staph. aureus 005	1,56	25	0,10 >	< 0,10
Staph. aureus 400	3,12	12,5	0,78 >	< 0,10
Strept. faecalis	100	12,5	1,56	0,20
Neisseria sicca	0,39	50	0,10	< 0,10
Treponema hyodysenteriae	—	—	—	0,19
Strep. pyogenes	0,39	12,5	0,10	< 0,10
Bacteriodes fragilis 35 614	25	50	0,73	0,78
Clostridium innocuum	6,25	> 100	0,20	0,39
Lactobacillus casei var. casei	3,12	6,25	0,20	0,39

Srovnatelné výsledky byly získány při zkoušení minoritního makrocyclického laktonu, sloučenina 35 763 (A'), a minoritního depsi-peptidu, sloučenina 37 932 (B'), jednotlivě nebo ve vhodných koncentracích, tj. $A' \neq A$, $B' \neq B$ nebo $(A' + B') \neq (A + B)$.

Maximální synergické účinnosti směsí čistých makrocyclických laktonů a depsi-peptidů se dosahuje jejich poměr asi 1 až 2:1. Přibližně takovýto poměr složek se vyskytuje ve vyfermentovaných živných půdách

A. auranticolor ATCC 31011 a v surových antibiotických směsích z nich izolovaných. Toto zjištění je v rozporu s jinými popsány mi synergickými směsmi, kde se synergické faktory jeví ve vyfermentovaných půdách a surových směsích při suboptimálních poměrech.

Údaje zjištěné in vivo o ochranném účinku dosaženém při perorálním a subkutánním podávání u myši pokusně infikovaných kmenem Staphylococcus aureus jsou podány v tabulce I.

TABULKA I

Hodnoty PD₅₀ (mg/kg)

	S. aureus 01A005	
	Perorálně	Subkutánně
Sloučenina 36 996	> 200	> 200
Sloučenina 37 277	> 200	> 200
Sloučenina 36 926 + 37 277 (1:1)	210	60
Surová antibiotická směs	150 až 200	72 až 120

Antibiotika vyrobená podle tohoto vynálezu mohou být pokládána za zvláště zajímavá jako růstové faktory u drůbeže a zvířat vzhledem k jejich širokému antibakteriálnímu spektru, a dále pro léčení dysenterie prasat vzhledem k význačnému účinku proti Treponema hyodysenteriae, což je anaerobní spirocheta, která tuto nemoc způsobuje.

Účinek na stimulaci růstu u surových antibiotických směsí byl zjišťován u mladých krmených selat ve 40denním pokusu. Průměrný denní přírůstek, spotřeba krmiva a krmená účinnost se význačně zlepšily ($p < 0,01$) ve srovnání s kontrolou bez antibiotika (tabulka II).

TABULKA II

Skupina	Průměrný denní přírůstek (kg)	Průměrná denní spotřeba krmiva (kg)	Krmná účinnost*)
kontrola bez antibiotika	0,35	0,91	2,57
surová antibiotická směs 50 ppm	0,63	1,35	2,15

*) hmot. díly krmiva na hmot. díl váhového přírůstku

Srovnatelné výsledky mohou být získány s jinými antibiotickými směsmi přesahujícími rozsah 10 až 100 ppm.

Srovnatelné výsledky mohou být získány také podáváním jednotlivých čistých sloučenin 36 926, 37 932 a 37 277 nebo směsí těchto čistých sloučenin, které se složením blíží složení surových antibiotických směsí.

Účinek na stimulaci růstu hospodářských zvířat byl demonstrován na slepicích v bakteriovém pokusu. Význačné zlepšení ($p < 0,1$) váhových přírůstků proti kontrole bez antibiotika bylo pozorováno na antibiotické dietě. (Tabulka III.)

TABULKA III

Skupina	Průměrný váhový přírůstek (g)	Průměrná spotřeba krmiva (g)	Krmná účinnost
kontrola bez antibiotika	566	939	1,66
surová antibiotická směs 10 ppm	608	949	1,56

Srovnatelné výsledky mohou být získány také s jinými surovými antibiotickými směsmi nad rozsahem 10 až 100 ppm.

Srovnatelné výsledky mohou být získány také podáváním jednotlivých čistých sloučenin 36 926, 37 932 a 37 277 nebo směsí čistých sloučenin, které se složením přibližují složení surových antibiotických směsí.

Profylaktický účinek antibiotik vyrobených podle tohoto vynálezu byl stanoven na

prasatech pokusně infikovaných infekčním materiálem způsobujícím dysenterii prasat. Obsah tlustého střeva a výškraby ze sliznice byly získány z epizootie klinicky diagnostikované dysenterie prasat. Zdravá prasata byla tímto materiálem infikována přímým očkováním. Krmivo obsahující antibiotikum bylo podáváno po dobu 28 dní. Výsledky jsou shrnuty v tabulce IV.

TABULKA IV

Skupina	Nemocnost (%)	Úmrtnost (%)	Průměrný denní přírůstek (kg)
kontrola	100	40	-0,13
surová antibiotická směs			
50 ppm	0	0	0,66
37,5 ppm	0	0	0,57
25,0 ppm	0	0	0,68
12,5 ppm	0	0	0,61
6,25 ppm	50	10	0,47

Srovnatelné výsledky mohou být získány u dávek nad rozsahem dávek 10 až 100 ppm i u jiných antibiotických směsí s jednotlivými čistými sloučeninami 36 926, 37 932 a 37 277 nebo směsmi surových antibiotických směsí.

Příklad 1

Antibiotický premix, kterého má být použito k přidávání do krmných směsí pro zvýšení využitelnosti potravy u nepřežvýkavců, lze vyrobit na základě předpisu následujícího složení:

Složky:	Procento
kukuřice	78,40
sójová mouka, 49 %	18,50
fosforečnan vápenatý	1,50
vápenec	0,50
jodidová sůl	0,50
vitaminový premix ^(a, b)	0,50
premix se stopovými prvky ^(b)	

(a) Odpovídá následujícím hladinám vitamínů v poměru na 453 g; vitamin A 2000 m. j.; vitamin D 200 m. j.; vitamin E 5 m. j.; vitamin K 1 mg; niacin 12 mg; riboflavin 1,5 mg; kyselina panthothénová 7 mg; cholinchlorid 500 mg; vitamin B₁₂ 10 µg.

(b) Odpovídá následujícím koncentracím stopových prvků v poměru k 1 miliónu: mangan 120, železo 40, měď 4, jod 2,4, kobalt 0,4, zinek 100.

Množství antibiotika obsaženého v každém 0,5 kg lze měnit podle přání. Výhodný antibiotický premix obsahuje 22,6 g antibiotika

na kg, který může obsahovat antibiotickou směs zahrnující sloučeninu 35 763, 36 926, 37 277 a 37 932 produkovaných fermentačně pomocí *Actinoplanes auranticolor* ATCC 31011, nebo sloučeninu 37 277 nebo sloučeninu 36 926 nebo sloučeninu 37 932. 0,5 kg premixu na 1000 kg kompletní dávky poskytuje konečnou koncentraci antibiotika 11 ppm.

Příklad 2

Tekutý antibiotický premixový koncentrát vhodný k přidání do pitné vody za účelem zvýšení účinnosti krmiva u nepřežvýkavců o žádané koncentraci lze připravit rozpuštěním antibiotické směsi obsahující sloučeninu 35 763, 36 926, 37 277 a 37 932 produkované za fermentačních podmínek pomocí *Actinoplanes auranticolor* ATCC 31011 nebo sloučeninu 37 277 nebo sloučeninu 36 926 nebo sloučeninu 37 932.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

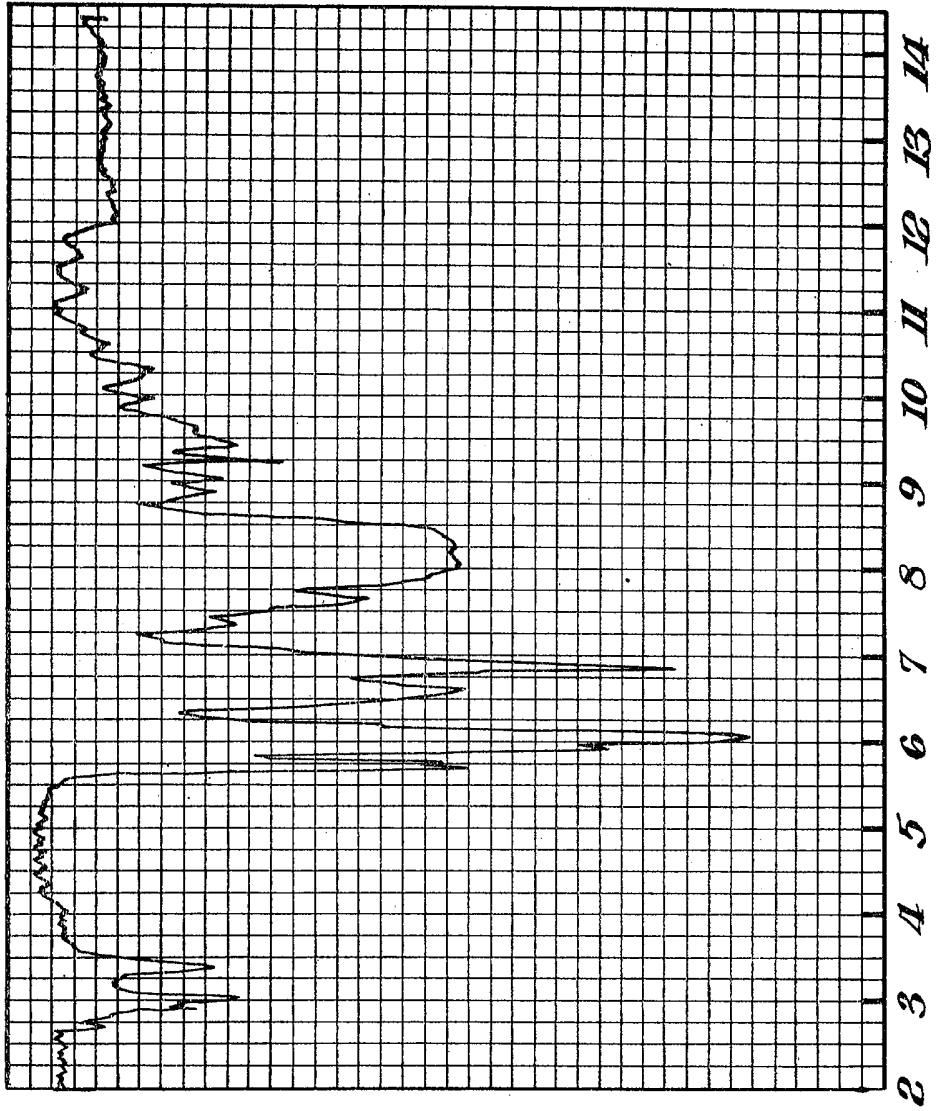
Krmná směs pro zvířata, obsahující obvyklé složky krmiv, vyznačující se tím, že obsahuje 10 až 100 ppm antibiotik tvořených makrocyclickými laktony 36 926 a

37 277 nebo depsipeptidem 37 932, získaných kultivací mikroorganismu *Actinoplanes auranticolor* ATCC 31 011, nebo jejich směsmi.

4 listy výkresů

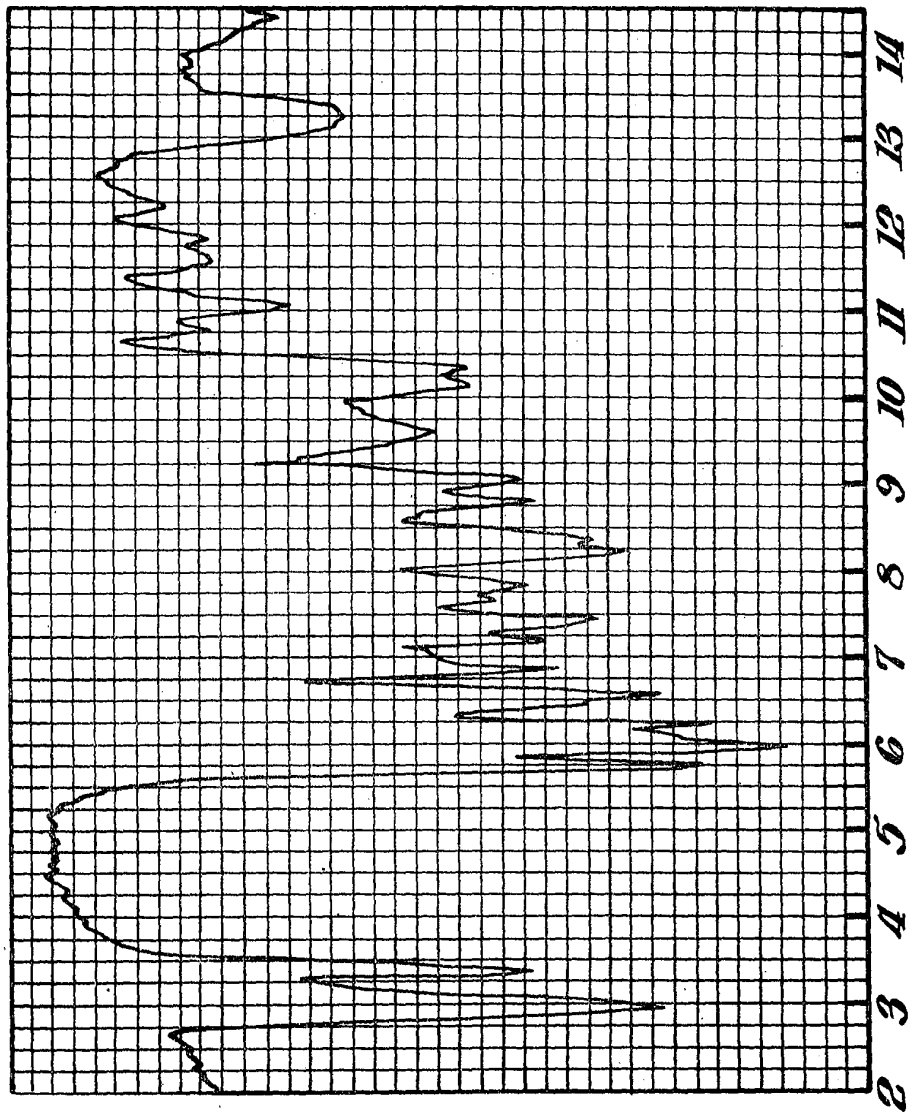
37,277

Obr. 1



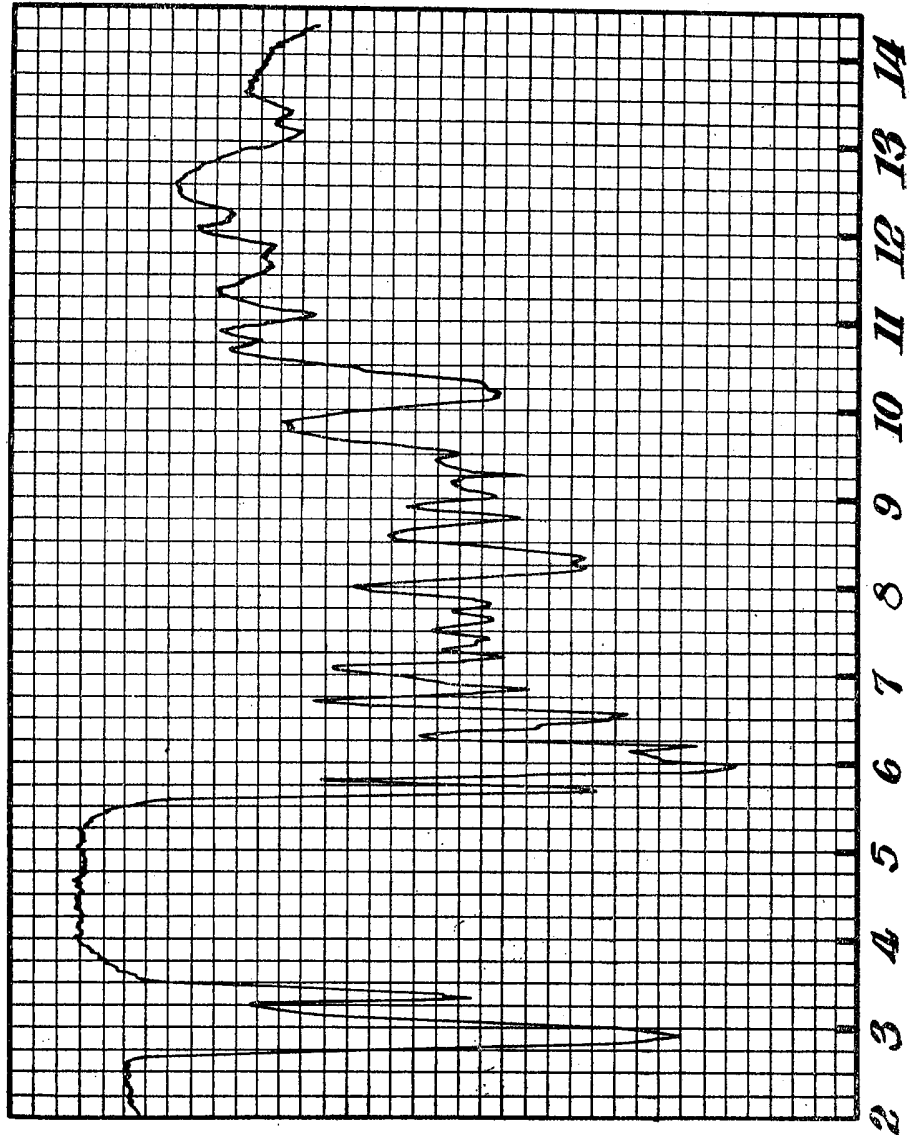
Obr. 2

36,926



35,763

Obr. 3



196263

Obi. 4

37932

