



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 88106047.X

[51] Int.Cl⁴
C12P 17/16

[43] 公开日 1989年2月22日

[22]申请日 88.8.12

[30]优先权

[32]87.8.13 [33]US [31]085039

[71]申请人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

[72]发明人 罗伯特·L·哈米尔

姚慈晃

[74]专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 杨 钢

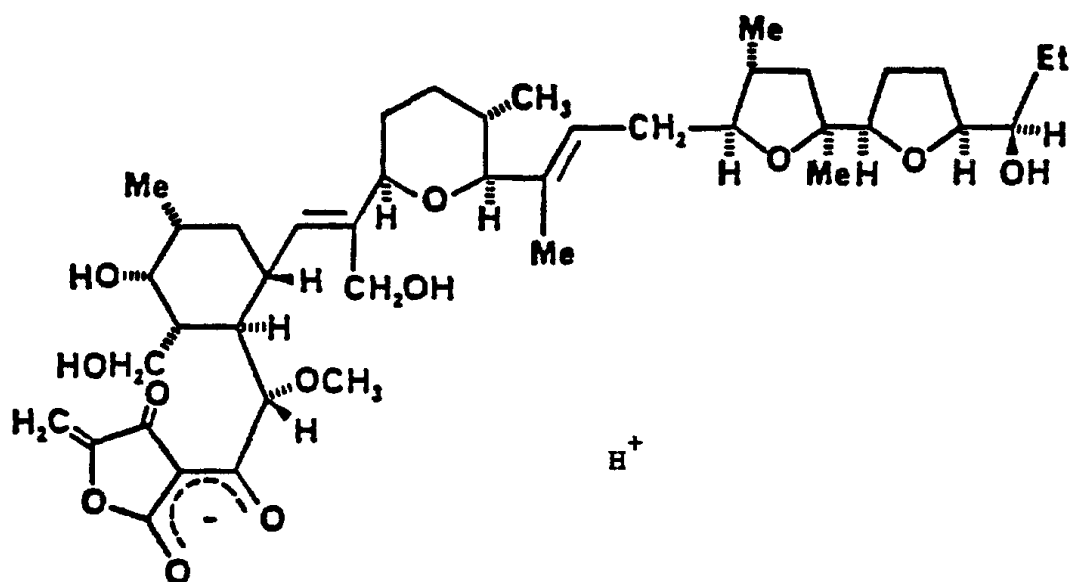
说明书页数: 20 附图页数: 2

[54]发明名称 抗生素 A80577 及其生产方法

[57]摘要

新的多醚类抗菌素 A80577 及其醚酯、烷醚衍生物和它们的盐可用作抗菌剂,并能增加动物的进食利用率。本发明还提供了通过培养 *Actinomadura* 属 *Verrucospora* 种制备 A80577 的方法以及含有 A80577 化合物的组合物。

1. 生产式 I 所示抗生素 A80577 的方法，式 I 为：



该方法包括：在含同源碳、氮和无机盐的培养基中，在浸水需氧发酵条件下，培养 *Actinomadura* 属 *Verrucosospora* 种或其产 A80577 的变种、突变体或重组体，直到产生抗生素 A80577 为止。

2. 按权利要求 1 所述方法，该方法包括从培养基中分离 A80577 的步骤。

3. 按权利要求 1 或 2 所述方法，其中使用 *Actinomadura* 属 *Verrucosospora* 种。

4. 按权利要求 1 至 3 所述任一方法，该方法包括 A80577 与阳离子型碱反应、形成相应盐的步骤。

5. 按权利要求 4 所述方法，其中阳离子型碱是氢氧化钠。

6. 按权利要求 4 所述方法，其中阳离子型碱是氢氧化钾。

7. 按权利要求 1 至 4 所述任一方法，该方法包括 A80577 或其盐与伯醇或硫醇反应、形成相应的烷醚衍生物的步骤。

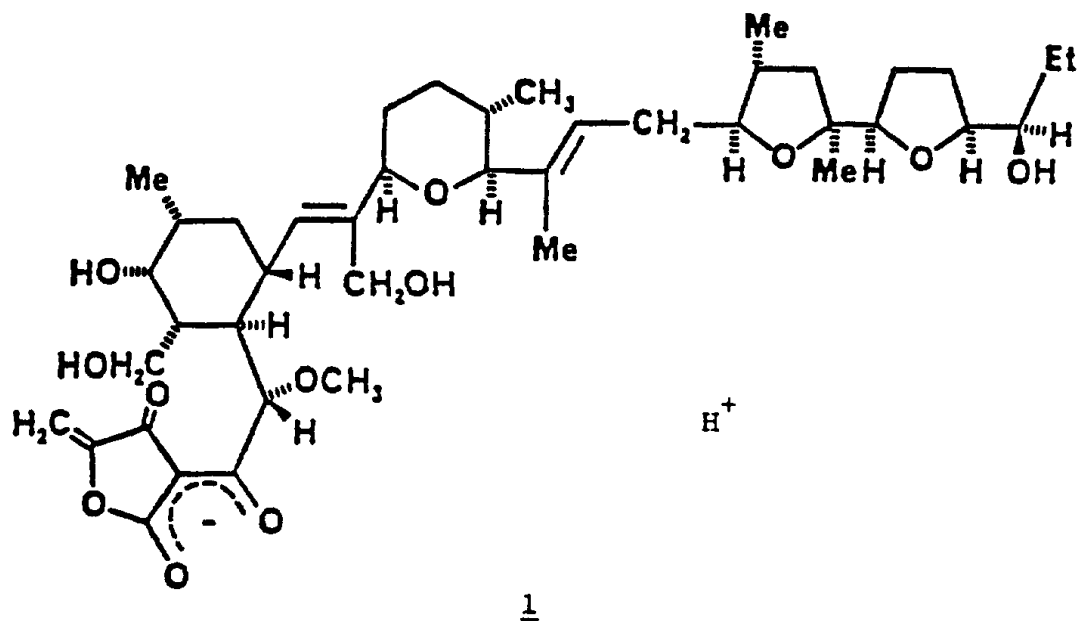
8. 按权利要求 1 至 3 所述任一方法，该方法包括 A80577 与酸酐或酰

氯反应、形成相应的酰酯衍生物的步骤。

9.按权利要求7 或8 所述方法，该方法包括所说衍生物与阳离子型碱反应、形成相应盐的步骤。

抗生素A80577及其生产方法

本发明涉及新的多醚类抗生素A80577及其产生这一抗生素的新菌株 *Actinomadura*属*Verrucosospora*种。A80577的结构如式 I 所示：



本发明还涉及A80577的酯和醚衍生物，以及A80577和这些衍生物的盐。

本发明的另一方面是抗生素A80577的生产方法。该方法是在浸水需氧发酵条件下，在含有同源碳，氮，和无机盐的培养基中，培养 *Actinomadura*属*Verrucosospora*种，或产生A80577的变种，突变体或重组体，直到产生抗生素A80577为止。从发酵肉汤和带有机溶剂的菌丝体中提取A80577。通过诸如柱层析的技术分离A80577，并进一步纯化之。

由于 *Actinomadura*属*Verrucosospora*种是新发现的菌株，所以本发明还提供了产生抗生素A80577的微生物或其变种，突变体或重组体的纯生物学培养方法。

A80577是有用的抗菌剂。它改善反刍动物的进食利用率，并可用作反刍动物和单胃动物助长剂。另外,A80577 具有杀寄生虫作用，并可用作离子载体抗生素。因此，本发明还涉及用于增加反刍动物进食利用率的一种食用组合物，该组合物包括：动物饲料和有效量的抗生素A80577及其酰酯或烷醚衍生物，或A80577的盐，或这些衍生物的盐；本发明还涉及增加进食利用率的方法，该方法包括给动物口服有效量的前述化合物。

下图是在氯仿中的红外吸收图谱：

图1 A80577(钠盐)

图2 A80577(钾盐)

就兽医领域而言，一直需要先进的抗生素。提高动物的助长作用是这类抗生素的理想特点之一。通过减少疾病以及增加进食利用率，可以收到助长效果。反刍动物（如：牛）的助长具有特殊的意义。

反刍动物饲料中主要营养物（碳水化合物）的利用机理是众所周知的。在动物瘤胃中的微生物降解碳水化合物，产生单糖，然后再把这些单糖转化成丙酸酯化合物。丙酸酯化合物经微生物学途径代谢，形成乙酸酯，丁酸酯或丙酸酯类，统称为挥发性脂肪酸(VFA)。

VFA 的相对利用效率与总体效率有关。因此，尽管采用乙酸酯和丁酸酯，但丙酸酯的利用率更高。产生丙酸酯的发酵率也大于丁酸酯或乙酸酯的发酵率。这就是额外利用率。因此，有益的化合物是通过刺激动物从代谢碳水化合物中产生更高比例的丙酸酯类，由此增加碳水化合物的利用率。

A80577是多醚抗生素族中的一个新成员。Westley 已经把现有的多醚分门别类(John W.Westley “多醚抗生素：天然存在的酸离子载体，Vol.2.Chemistry,” Marcel Dekker,New York,1983;Journal of Natural Products ,49(1),35 (1986))。采用Westley 系统,A80577

是多醚族第四类新成员。该族包括在“J.Antibiotics,142(1982)”中介绍的tetronomycin,“J.Chem.Soc.,Chem.Comm.,1073(1981)”和美国专利4,279,849中介绍的M139603。

A80577(钠盐)具有有下列特征:

收态:白色结晶体(由丙酮-水结晶)

mp:(钠盐)276-278℃

(钾盐)270-272℃

分子量:782〔质谱场解吸(FDMS)〕;760(酸式)。

$[\alpha]_D^{25}$: -89.03(C5, MeOH)

非滴定基团(66% DMF)

实验分子式: $C_{42}H_{63}O_{12}Na$

UV_{max}: 中性乙醇253nm(ϵ -17,735), 289nm(ϵ -10,003)

酸式250nm(ϵ -14,715), 298nm(ϵ -7,971)

碱式208nm(ϵ -192,222), 248nm(ϵ -15,968),

286nm(ϵ -9,665)

IR(钠盐, $CHCl_3$): 3018, 2966, 2931, 1750, 1611, 1453, 1439, 1219, 1022, 1012 cm^{-1} (见图1)

IR(钾盐, $CHCl_3$): 3023, 3019, 2967, 2964, 2930, 2974, 1750, 1650, 1451, 1437, 1224, 1214, 1210, 1079, 1059, 1022, 1012 cm^{-1} (1见图2)。

溶解度: 略溶于水; 溶于下列溶剂: 二甲亚砜, 二甲基甲酰胺, 低级醇类(如: 甲醇) 酮类(如: 丙酮), 酯类(如: 乙酸乙酯), 卤代烷烃类(如: 氯仿), 烷烃类(如: 乙醚, 苯, 甲苯和温热的己烷)。

根据其物理特征, 可以确认A80577具有式I所示的结构。正如其结构所示, A80577是带电荷的分子, 并可以形成盐。A80577还有可至四个

可酯化或可形成醚衍生物的羟基。A80577的酯和醚衍生物，以及A80577和上述衍生物的药物上可以接受的盐也可用作抗生素以及用作增加进食利用率的药物。

本文所采用的“A80577化合物”一词意指抗生素A80577(式I), 抗菌素A80577的酯或醚衍生物，或者是抗生素A80577的药物上可以接受的盐或其酯或醚衍生物。

按本文所述，通过培养Actinomadura属Verrucosospora种的产A80577菌株，制得抗生素A80577。在适宜的培养基中，于浸水需氧条件下产生该抗生素，可通过采用本领域公知的各种分离和纯化方法，从所述培养基中回收该抗生素。

产A80577生物的培养基已有保藏，并已成为下述机构保藏培养基中的一部分：Midwest Area Northern Regional Research Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, 按照登记号NRRL 18236, 公众可以容易地从该机构中得到它。

Lilly 研究实验室的Frederick P. Mertz 对这一生物体进行了分类学研究。根据这些研究，该生物体属于Actinomadura属〔Lechevalier和Lechevalier, 1970, In Prouser, H. (ed) “放射线菌素” VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, PP. 393-405〕。

本文所遵循的是用于鉴定链霉菌属的国际链霉菌属工程(ISP)所推荐的方法〔E. B. Shirling和D. Gottlieb, “链霉菌属鉴定方法”, Int. J. Syst. Bacteriol. 16(3), 313-340 (1966)〕。

用ISP No. 1(酵母胰胨肉汤), ISP No. 6(酵母胰铁琼脂), ISP No. 7(酪氨酸琼脂)测定了黑色素产物。

在ISP No. 4(无机盐-淀粉琼脂)平皿上用碘试验所存在的淀粉，由此测定淀粉水解。

用光学显微来研究形态。采用电子扫描显微镜(SEM)研究芽孢表面修饰。

ICSS-NBS短心颜色曲线图,标准样品No.2106(National Bureau of Standards,1958,U.S.Department of Commerce.Washington.D.C.)和色泽协调手册(4th ed.,Color Standards Department,Container Corporation of America,Chicago,Illinois,1958)用来分别确定反面和孢团颜色的名称。

采用Becker等人的层析法确定整体细胞水解产物中的二氨基庚二酸(DAP)异构体和碳水化合物。该方法见:〔B.Becker,M.P.Lecchevalier,R.E.Gordon,和H.A.Lecchevalier,“用整体细胞水解产物纸色谱法快速鉴定放射线菌属和链霉菌属”,Appl.Microniol,12,421-423(1964)〕和Lecchevalier的〔M.P.Lecchevalier,和H.Lecchevalier“厌氧链霉菌属分类中的标准化学组份”,Int.J.Sust.Bacteriol.20,435-443(1970)〕。

将抗生素敏感圆面衬垫在接过种的ISP No.2琼脂平板上,由此来测定对抗生素的耐药性。

培养特征

A80577培养在复合的和限定的培养基上均生长良好。孢块缓慢形成,其为白色。反面由黄白色变为淡黄色。未观察到明显的色素,除了几个介质上有浅的黄褐色色素外,未观察到可溶色素。表I给出了上述培养特征。

表 I

A80577的培养特征, 30 °C, 保温18天。

ISP No.2	G(生长): 丰富	Czapek琼脂	G: 中等
	R(反面): 88.d.y.		R: 92.y 白色
	C(空白): 痕迹a 白色		Am(气菌丝体): 中等:a 白色
	Sp(可溶色素): 无至1.yBr		Sp: 无
ISP No.3	G: 中等	番茄酱燕麦 片琼脂	G: 差
	R: 92.y 白色		R: 88.d.y.
	Am: 中等:a 白色		Am: 差:a 白色
	Sp: 无		Sp: 无
ISP No.4	G: 良好	土豆萝卜 琼脂	G: 良好
	R: 92.y 白色		R: 89.p.Y.
	Am: 良好:a 白色		Am: 良好:a 白色
	Sp: 无		Sp: 无
ISP No.5	G: 丰富	Jensen 琼脂	G: 差
	R: 89.p.Y		R: 92.y 白色
	Am: 良好:a 白色		Am: 差:a 白色
	Sp: 无		Sp: 无
ISP No.7	G: 良好	葡萄糖 天门冬酰氨	G: 良好
	R: 90.gp.Y		R: 89.p.Y.
	Am: 无		Am: 良好:a 白色
	Sp: 无		Sp: 无

	G:良好		G:只有痕迹
	R:89.p.Y	甘油甘氨酸	R:-
No.172	Am:良好:a白色		Am:-
	Sp:无		Sp:-
	G:无生长		G:丰富
自来水	R:-	酵母葡萄糖	R:87.m.Y.
琼脂	Am:-	琼脂	Am:中等:a白色
	Sp:-		Sp:无至1.yBr
	G:丰富		
Emerson	R:87.m.Y		
2.脂	Am:痕迹:a白色		
	Sp:无至1.yBr		

形态学特征

培养A80577产生大量的基质菌丝体。缓慢形成的需氧菌丝产生许多由紧密包裹的短链组成的群集体，并按照Rectus-flexibilis (RF) 形态学排列。这种形态是典型的Actinomadura属。芽孢的形状呈球形，平均大小为 $0.8 \mu\text{m}$ ，并且芽孢表面具有独特的颗粒外观。每个孢子链所含孢子数少于10。

生理学特征

水解后的整体细胞经分析表明有新-二氨基庚二酸存在。在该整体细胞提取物中检测出了Madurose。还检测出了半乳糖，葡萄糖，甘露糖和核糖。细胞壁为Ⅲ型，糖式为B型。半乳糖是不典型的B糖式。

培养物A80577利用了下列碳水化合物：核糖醇，D-和L-阿拉伯糖，纤维素二糖，半乳糖醇，乙醇，i-赤藓醇，D-果糖，D-半乳糖，葡萄糖，甘油，糖原，i-肌醇，D-甘露糖醇，D-甘露糖，D-松三糖，D-密二糖，L-鼠李糖，D-核糖，蔗糖，D-海藻糖，D-木糖和丁酸钠。而不能利用的

有：纤维素，糊精，菊粉，D- 乳糖，D- 麦芽糖， α - 甲基-D- 糖苷，D- 棉子糖，水杨苷，山梨醇，L- 山梨糖，木糖醇。不加碳水化合物的对照平皿维持最低生长。

A80577培养物在15-45 °C 的温度范围内生长，显然，最佳生长温度在30和37°C 之间。A80577耐受NaCl的浓度高达4%，产生过氧化氢酶并还原硝酸盐。它不能水解淀粉。

A80577对下述抗生素有抗性：杆菌肽10单位，头孢菌素 I 30 μ g，林可霉素 2 μ g，竹桃霉素15 μ g，青霉素G10 单位，利福平 5 μ g，四环素 30 μ g。它对下列抗生素敏感：庆大霉素10 μ g，新霉素30 μ g，链霉素 10 μ g，托普霉素10 μ g，万古霉素30 μ g。

A80577的化学分类学性质和综合培养及形态特征均支持该菌株属于 *Actinomadura* 属 *Verrucosospora* 种。因此，把这一菌株分类为 *Actinomadura* 属 *Verrucosospora* 种 A80577。

与其他生物体一样，产生A80577的培养物 *Actinomadura* 属 *Verrucosospora* 种的特征也要发生改变。采用本领域公知的技术可以获得该菌株的重组体，突变体和变种。例如，通过用各种已知的物理和化学致变物（如：紫外光，X射线， γ 射线，化学物质，如：N- 甲基-N'-硝基-N- 亚硝基胍）处理，可以得到突变体。持有产A80577特征的该 *Actinomadura* 属 *Verrucosospora* 种菌株的所有天然和诱发变体，突变体和重组体均属于本发明的内容。

用于培植 *Actinomadura* 属 *Verrucosospora* 种的培养基可以是为数众多的培养基中的任何一个。但是为使生产经济，收率高，易于分离产品，最好选择某些培养基。例如，虽然也可使用赤糖糊糖浆 (blackstrap molasses)，淀粉等类似的糖，但大规模发酵中的优选碳水化合物源是葡萄糖。

尽管也可以使用其他氮源，但最好的氮源是酶水解的酪蛋白。

掺入培养基中的营养性无机盐最好是惯用的、可得到下列离子的可溶性盐： Zn^{++} 、 Na^{+} 、 Mg^{++} 、 Ca^{++} 、 NH^{+} 、 Cl^{-} 、 CO_3^{--} 、 SO_4^{-} 、 NO_3 和其他类似的离子。

培养基中还应该包括对生物体生长发育所必须的主要微量元素。这些微量元素通常以夹杂物的形式出现在培养基的其他取代成份当中，其含量足以满足该生物体的生长需要。如果出现泡沫问题，可按照需要，在大规模发酵基中加入少量的（即：0.2ml/L）抗发泡剂（如：聚乙二醇）。

为了大量生产抗生素A80577，选用罐内浸氧发酵法。摇瓶培养可得到少量的A80577。

由于用生物孢子进行大罐接种，在抗生素生产中经常出现时间迟滞，因此，最好采用营养接种物。通过在少量的培养基上接种生物芽孢或菌丝体片断，得到新鲜的生长活跃的生物培养体，由此制得营养接种物。然后将该营养接种物移至大罐中。该营养接种物基质可以采用与大规模发酵相同的基质，但也可以采用其他适宜的介质。

当生长温度约为25℃至37℃时，*Actinomadura*属产生A80577。生产A80577的最好温度似乎是约30℃。

按照常规的浸水需氧培养方法，将无菌空气从反应器底部通入反应器，同时用惯用的涡轮式搅拌叶轮搅拌该基质。一般吹气速率和搅拌速率应维持溶解氧在30% 的饱和水平或更高。

在发酵期间检测肉汤样品对某些已知敏感于该抗生素的生物之抗菌作用，可跟踪抗生素A80577的生产情况。一种用于检测A80577的试验生物体是枯草杆菌ATCC6633。用琼脂平板测试法可以方便地进行该生物测试。

按照该浸水需氧发酵条件下的生产方法，采用发酵领域中所使用的方法，可以从发酵基质中回收A80577。产A80577生物体在发酵期间所产生的抗菌活性存在于菌丝体和肉汤中。因此，通过最初将基质过滤，把

肉汤与菌丝体块分开，可达到A80577的最大回收。分别将经过滤的肉汤和菌丝体块进一步纯化，得到各自的A80577部份。可采用各种技术进行这一纯化。

用于纯化过滤肉汤的优选技术是将其调至约pH9,然后用适宜的溶剂，如，乙酸乙酯提取之。然后减压下蒸掉提取溶剂，得到肉汤部分的A80577。

纯化菌丝体块的优选方法是用适宜的溶剂(例如：丙酮),抽提分离后的菌丝体滤块。减压蒸掉提取溶剂，得到浓缩水溶液。将该水溶液调至约pH9,用适宜的溶剂，如，乙酸乙酯，提取之。然后将提取溶剂减压浓缩，得到菌丝体部分的A80577。

用类似的方法进一步纯化肉汤部分和菌丝体部分A80577的混合物。优选的方法包括硅胶色谱法。

采用薄层色谱(TLC)或高效液相色谱(HPLC)法，可以完成抗生素A80577的分离。适宜的硅胶TLC 溶剂体系是：乙酸乙酯，乙酯乙酯：乙腈：氢氧化铵和甲苯：乙腈：乙酸。优选的硅胶溶剂体系是：乙酸乙酯：乙腈：氨(90:9:1)，和甲苯：乙腈：乙酸(40:59:1)。使用聚酰胺板也很方便，其溶剂系统是丙酮：水：氨，优选比例为30:69:1。用枯草杆菌的生物自显影法或其他方法(如：香草醛- 硫酸喷洒剂)可以检测该抗生素。

另外，培养固体，包括基质组份和菌丝体都可不经提取或分离而作为A80577的来源使用，但最好先除去水。例如,A80577 产生后，可以通过冻干，滚筒干燥，或共沸蒸馏及干燥法将整个发酵肉汤干燥。然后将经干燥的肉汤直接混入进食预混物。

A80577的盐以及其衍生物的盐可用来分离和纯化该抗生素。药物上可以接受的盐尤其有用。这些盐的例子是A80577及其衍生物的碱金属和碱土金属盐。

具有代表性的、适宜的A80577的碱金属和碱土金属盐包括：钠盐，钾盐，锂盐，铯盐，铷盐，钡盐，钙盐，镁盐。

就兽药领域而言，众所周知的是 在用该抗生素治疗动物时，抗菌素的剂型一般并不十分重要。在多数情况下动物的体内因素使原服用药物的形式发生改变。因此，以盐的形式服用并不十分重要。但是出于经济，方便，毒性的原因，可以选择盐的形式。

按照制备阳离子盐所采用的一般方法，可制得A80577的碱金属和碱土金属阳离子盐。例如，将A80577的游离溶解在适宜的溶剂（如：丙酮）中，加入药1/2 体积的水，用所期望的阳离子盐的碱（如：NaOH, KOH）将该溶液调至约pH9 至10。采用惯用方法（如：过滤或蒸发溶剂），可分离由此形成的盐。

形成盐的优选方法是：将A80577（酸式）溶解在溶剂（如：四氢呋喃）中，加入等量的水，用相应的阳离子碱（如：NaOH, KOH 等）将该混合物调至pH10；然后用与水不混溶的溶剂（如：乙醚或乙酸乙酯）提取即得。用水洗涤分离后的有机相，并浓缩至干。残留物用二噁烷冻干。该盐用适宜的溶剂（如：丙酮）结晶。

A80577的烷基醚衍生物是式中由YR基团取代了一个或多个羟基的那些化合物，其中：

Y 代表O 或S；

R 代表C₁₋₆ 烷基, C₁₋₄ 烷氧基-C₂₋₅ 烷基, C₁₋₄-烷氧羰基-C₂₋₅ 烷基, 氨基-C₂₋₅ 烷基, 巯基-C₂₋₅ 烷基, 羟基烷基, 卤代烷基, 或 (R') - 苯基(CH₂)_n, 其中: R' 代表C₁₋₄ 烷基, C₁₋₄ 烷氧基, 或羟基, n代表0-2; n 代表0-3 。

术语“烷基”意指C₁至C₇直链或支链烷烃。最好是C₁至C₄烷烃，如：甲基，乙基，丙基，异丙基，正丁基等。

术语“烷氧基”意指其中具有氧官能团取代的C₁至C₇低级烷基，如：

甲氧基，乙氧基，丙氧基，和类似基团。

术语“羟基烷基”或意指单羟基- C_{1-5} 烷基残基，或者当Y 是O 时，意指2,3-二羟基丙-1-基残基。

术语“卤代烷基”意指含1 至3 个卤原子取代的 C_{2-5} 烷基残基，所说卤原子选自溴，氯，氟。当所说烷基是二卤或三卤取代烷基时，卤素取代基必须是同一卤素。

优选的A80577醚衍生物是式中Y 代表O,R 代表 C_{1-6} 烷基的那些化合物。A80577或其盐与相应的伯醇或硫醇反应，即可制得上述醚衍生物。

以某些醇或硫醇作原料时，有必要在该反应中加入酸催化剂。适宜的催化剂包括：盐酸，硫酸，高氯酸，甲磺酸，苯磺酸，甲苯磺酸，二氧化硒，三氟化硼。

为加快反应可加入下列某一溶剂：水，丙酮，苯，醚，四氢呋喃，二噁烷。尽管也可采用较高的温度，但一般在室温下进行反应。

A80577的酯衍生物是式中一个或多个羟基由式 $R_i-\overset{\overset{O}{||}}{C}-O-$ 取代的那些化合物，其中 R_i 是 C_{1-6} 烷基或氢。A80577与相应的酸酐或酰氯反应可制得A80577酯衍生物。只将A80577中多个羟基中的一个羟基酯化。在室温下,A80577 与相应的酸酐反应很容易制得这些酯。

尽管有时采用一般反应操作法即可，但要得到本发明化合物，还可能需要进一步纯化。采用众所周知的方法，例如：柱色谱，薄层色谱，分馏结晶等，即可完成这一纯化。

A80577化合物能抑制使动物致病的菌的生长。表Ⅲ给出了最低抑制浓度(MIC),在该浓度下A80577抑制某些生物。表Ⅲ中的MIC 是通过惯用的琼脂稀释试验确定的。

表Ⅲ：A80577 的抗菌作用（钠盐）

受试生物	MIC(mcg/mL)
金黄色葡萄球菌 X1.1	0.5
金黄色葡萄球菌 V41	0.5
金黄色葡萄球菌 X400	0.5
金黄色葡萄球菌 S13E	0.5
表皮葡萄球菌 EPI1	0.5
表皮葡萄球菌 222	0.5
生脓链球菌 C203	0.125
肺炎链球菌 Park1	0.125
肺炎链球菌 X66	0.5
肺炎链球菌 2041	0.5
发否氏杆菌	32-128
其他草兰氏阴性菌试验	>128
兽医生物	
葡萄球菌属	<0.05
链球菌属	<0.05
出血败血性巴斯德氏菌	1.56
溶血性巴斯德氏菌	>50
支气管败血性博代氏杆菌	>50
支原菌属gallisepticum	0.78
支原菌属hyopneumoniae	1.56
大肠杆菌	>50
鼠伤寒沙门氏菌	>50

A80577化合物还具有抗厌氧菌的作用。表Ⅳ给出了由标准琼脂稀释实验测定的、A80577抑制各种厌氧菌的MIC。保温24小时后记录最后读

数。

表Ⅳ：厌氧菌分离体对A80577(钠盐) 的敏感性

厌氧菌	MIC(mcg/mL)
梭状芽胞杆菌属difficile 2994	<0.5
产气荚膜梭状芽胞杆菌 81	<0.5
败血梭状芽胞杆菌 1128	<0.5
Eubacterium aerofaciens 1235	<0.5
发酵球菌asaccharolyticus 1302	<0.5
发酵球菌prevoti 1281	<0.5
厌氧发酵链球菌 1428	<0.5
中间发酵链球菌 1624	<0.5
丙酸菌属痤疮菌 79	<0.5
胞弱拟杆菌 111	>128
胞弱拟杆菌 1877	>128
胞弱拟杆菌 1936B	>128
拟杆菌属thetajotaomicron 1438	4
黑色素拟杆菌 1856/28	1.0
黑色素拟杆菌 2736	16
拟杆菌属vulgatis 1211	4
拟杆菌属corrodens 1874	>128
共生梭〔形杆〕菌 1470	<0.5
梭杆菌属necrophorum 6054A	<0.5

通过腹膜内注射给药测定了A80577对大鼠的急性毒性，以LD₅₀表示，为53.3gm/kg。

A80577化合物的另一重要性质是改善动物进食利用率的能力。例如，A80577化合物可以改善具有发达的瘤胃器官的反刍动物的进食利用率。

采用Arthur P.Raun 在美国专利3,794,732(尤其参见实施例5)中所述方法,通过观察瘤胃中丙酸酯化合物的产生及浓度水平可以测得进食利用率。表V列出了A80577化合物对反刍动物进食利用率的影响。表VA列出了A80577的剂量和产生丙酸酯类化合物之间的关系。表VB列出了经A80577处理过的瓶中易挥发脂肪酸(VFA)与该试验对照瓶中浓度的比例。

表V:A80577(钠盐)对反刍动物进食利用率的影响。

A				
		丙酸酯产物, mM/d		
剂量, ppm	观察值	中 项	标准差	
0	26	9.6	1.4	
0.04	14	14.3	1.7	
0.2	14	14.8	1.4	
1.0	14	22.3	3.4	
5.0	14	21.8	2.7	

B				
处理组与对照组的比值				
剂量	摩尔%	摩尔%	摩尔%	VFA 总量
mcg/mL	丙酸酯	乙酸酯	丁酸酯	mM/L
1.0	1.532	0.845	0.754	0.858
2.5	1.459	0.851	0.827	0.823
5.0	1.562	0.799	0.839	0.773
10.0	1.709	0.772	0.728	0.876

LSD: 双盲t 试验, 显著性 $P < 0.01$, $C > 99\%$ 高于可信限度。

就增加丙酸酯而言, A80577 化合物特别有效。因此, 以约0.01mg/kg/天至约1.0mg/kg/ 天的比例给反刍动物口服该化合物时, 可以改善进食利用率。优选的服用剂量是约0.06mg/kg/天至约0.35mg/kg/

天。优选的服用方法是该化合物与动物饲料混合。适用于增加反刍动物进食利用率的进食组合物一般包括饲料比例和0.5 至50g A80577化合物/ 吨饲料，最好是2 至15g/吨。

按照supra 的描述,A80577 化合物具有抗厌氧菌的作用，包括抗产气荚膜杆菌。因此，可将A80577化合物用于治疗（包括预防）鸡，猪，牛，羊的肠炎。还能将A80577化合物用于治疗反刍动物的肠原性毒血症。

可以通过口服或经胃肠道外给动物服用A80577化合物。服用A85077化合物最实用的途径是将其配入饲料中。可以使用各种饲料，包括普通干饲料，液体饲料，颗粒饲料。尽管优选服用方法是将其与动物饲料混合，但也可以以其他方法服用，例如，以片剂，兽用饮剂，大丸剂或胶囊剂服用。每个剂量单体中A80577化合物的含量应该与受治动物的适宜日剂量直接联系。

将药物配进动物饲料的方法是众所周知的。优选方法是先制备高浓度含药预混合物，然后再将其用于制备药用饲料。典型的预混合物中，每磅预混合物可以含有约1 至约200g 药物。该预混合物既可以是液体，也可以是固体制剂。

用于动物的药物最后配方应取决于欲服用药物量。可采用配制，混合，制丸饲料的一般方法，制备含A80577化合物的饲料。

可以采用兽药领域公知的方法将A80577化合物配制成适于胃肠道外给药的制剂。含A80577化合物的有效的注射用组合物既可以是悬浮剂，也可以是溶液。就溶液剂而言，是将A80577化合物溶解在生理上可以接受的载体中。这类载体包括适宜的溶剂，必要的话，包括防腐剂（如：苯醇），和缓冲液。有用的溶剂包括：例如，酒精，丙二醇，或者是惰性油，如，植物油或高精制矿物油。

采用非溶剂将该化合物与作为载体的添加剂混合制得注射用悬浮剂组合物。该非溶剂可以是水或乙二醇（如：聚乙二醇）。

为了使该化合物在悬浮组合物中保持悬浮态，有必要加入适宜的生理上可以接受的添加剂。所述添加剂可以选自增稠剂，如：羧甲基纤维素，聚乙烯吡咯烷酮，凝胶，藻酸盐。许多表面活性剂也可以用来悬浮该类化合物。在液体非溶剂中可用作悬浮剂的有：卵磷脂，烷基苯酚聚乙烯氧加成物，萘磺酸盐，烷基苯磺酸盐，聚氧乙烯脱水山梨醇酯。

能够影响液体非溶剂的亲水性，比重，表面张力的许多物质均有助于制备注射用悬浮剂。例如，硅氧烷抗泡沫剂，乙二醇，山梨醇和糖均可用作悬浮剂。

为对本发明的实施作更充分的说明，提供下列实施例：

实施例1

A. *Actinomadura* 属 *Verrucosospora* 种的摇瓶发酵

将保存于液氮中的冻干丸状或悬浮状 *Actinomadura* 属 *Verrucosospora* 种培养物用于接种含有下列组份的营养基质：

营养或种基质

成份	量 (g/L)
葡萄糖	10.0
可溶淀粉	20.0
酶水解酪蛋白*	5.0
酵母提取物	5.0
CaCO ₃	1.0
去离子水	适量至1 升

*N-Z Amine A, Humko-Sheffield Chemical, Norwich, NJ.

将2.5%琼脂加到该种基质中，制得斜面或平板。将接种过的斜面在30℃保温约10至14天。用无菌工具在成熟的斜面培养物上划线，使孢子松散，除去并浸解菌丝体衬垫。将由此得到的约1/4 松散孢子和培养生长物用于接种50ml 第一阶段种基质。

在振荡器上，将接种后的第一阶段基质在250ml 的Erlenmeyer烧瓶中，于30℃，保温约72小时，同时使该振荡器以250rpm，以两英寸(5.08cm)的周长做圆周运动。

用该保温过的第一阶段基质(91.00mL)接种具有下列组份的生产基质：

成份	量(g/L)
葡萄糖	25.0
赤糖糊糖浆	15.0
酶水解酪蛋白*	5.0
MgSO ₄ (无水)	3.0
CaCO ₃	1.0
自来水	适量至1 升

*N-Z Amine A

在振荡器上，将接种后的生产基质在250ml 的广口Erlenmeyer烧瓶中，于30℃保温8 至10天，同时，该振荡器以250rpm，以两英寸周长做圆周运动。

B. *Actinomadura* 属 *Verrucosospora* 种的罐发酵

为了提供大量的接种，将如A 节所述方法制备的10ml 第一阶段培养基接种于400ml 第二阶段生长基质，该基质的成份与第一阶段基质相同，将该第二阶段营养基质在2 升Erlenmeyer广口瓶中，于30℃保温48小时，以25rpm 转速在2 英寸圆周内摇动。

将由此制得的保温过的第二阶段营养基质(400ml) 用于接种过的100 升无菌生产基质，后者除加入抗泡沫剂P-2000(0.1mL/L) 和Sag471(0.2g/L)外，制备方法与A 节所述相同。于30℃，在165 升搅拌发酵罐内使该接种过的基质发酵4 至5 天。在该搅拌反应器中(200-250rpm)调节空气流量(0.5-0.6 v/v/m)，使溶水氧水平保持在室气饱和度30% 以上。

实施例2 A80577 钠盐的分离

合并来自2份100L发酵液的发酵肉汤(187L)，并用3%Huflo Supercel过滤。将菌丝体滤块用40L 丙酮提取两次。合并丙酮提取液，减压浓缩除去丙酮。将浓缩液(20升)与肉汤滤液(162升)合并，用50% NaOH将该溶液调至pH9.0,然后用125升乙酸乙酯提取之。将乙酸乙酯提取液减压浓缩，残留物于5℃放置结晶。依次用戊烷，乙腈，乙醚洗涤该结晶，真空干燥，得到36.4g 白色晶体状A80577钠盐(m.p.275-278℃)。

将1.0g该结晶溶解在100ml 丙酮中，加入100ml 水，于5℃放置72小时让其结晶。另加入100ml 水：丙酮(3:1)使结晶完全。滤出结晶，干燥，得到788mg 纯品(m.p.276-278℃)。

从上述合并洗液及母液中还可进一步回收A80577的钠盐，具体方法是：将溶液浓缩至干，溶解在250ml 甲苯中，然后注入含有2升硅胶(Grace Grade 62)甲苯浸湿的层析柱，该柱先用10升甲苯洗涤，然后依次用10升甲苯/乙醇(98:2)和10升甲苯/乙醇(96:4)洗脱，收集1升馏份。用TLC跟踪该洗脱过程，并用枯草杆菌进行生物测定。合并含A80577的馏份13-18,减压浓缩，用乙醚洗涤该残留物，干燥，得到2.3g 非晶形A80577钠盐。

实施例3

A80577游离酸的制备

将A80577钠盐(1g)溶解在100ml 丙酮中，加入0.1N的盐酸(100ml)，将该溶液搅拌15分钟，该溶液用乙酸乙酯(每次100ml)提取两次，合并乙酸乙酯提取液，减压浓缩至油状残留物，将该残留物溶于二噁烷(50ml)中，冷冻干燥，得到0.9g A80577 酸。

实施例4

A80577钾盐的制备

将A80577(酸式,100mg) 溶解在四氢呋喃(20ml)中, 加入水(3ml) 和2N的KOH(6ml), 将该混合物搅拌15分钟, 加入水(30ml), 该溶液用二乙醚(每次60ml) 提取两次, 合并提取液, 减压下蒸发至干。将残留物溶解在二噁烷中, 冷冻干燥, 得到100mg A80577钾盐(m.p.270-272℃)。

图 1

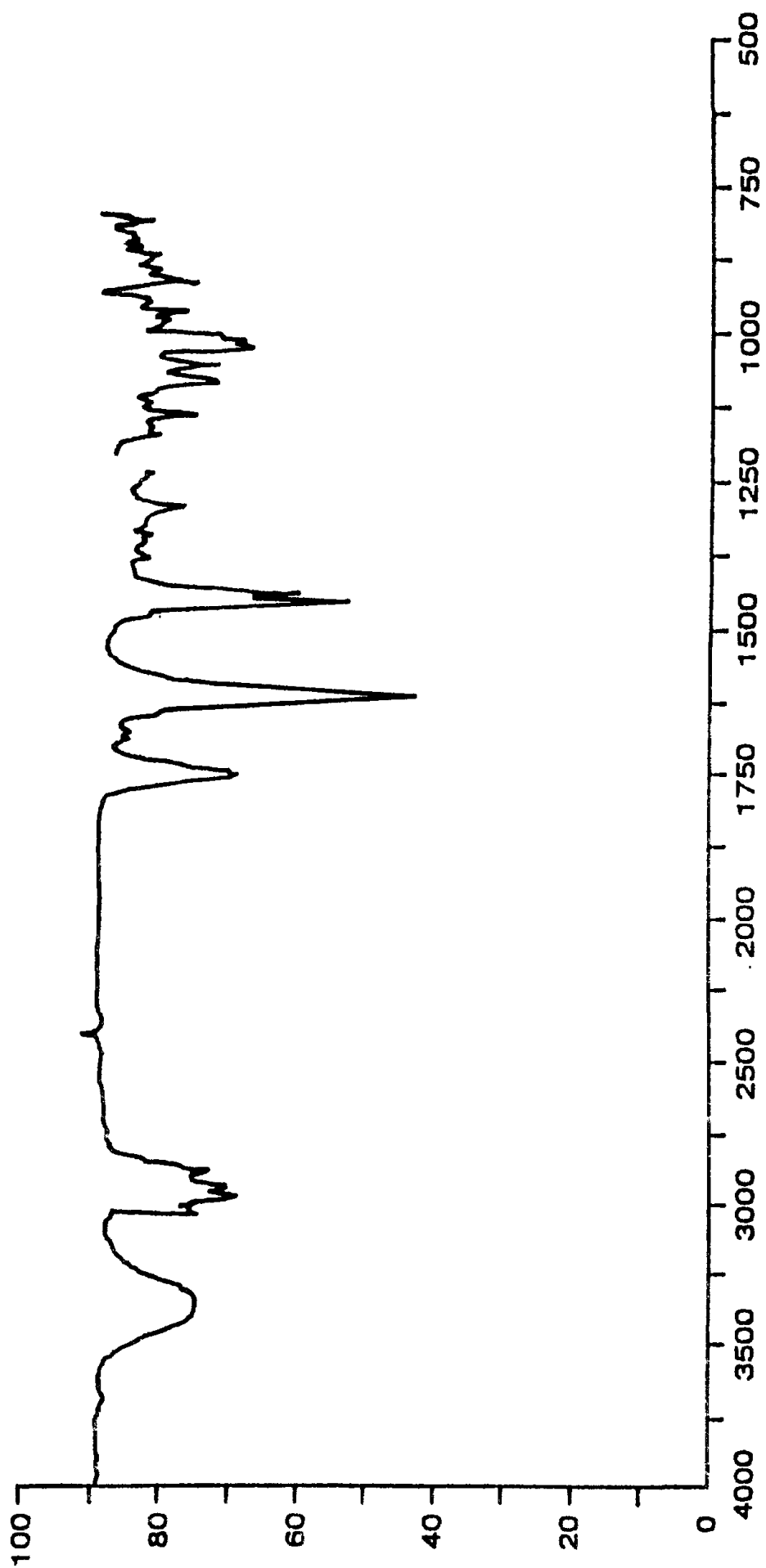


图 2

