

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 821347 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **821347**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
A23K

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **19.04.1982**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **19.04.1982**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **21.10.1982**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

20.04.1981 US 255,901

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Eli Lilly and Company, 307 East McCarty Street, Indianapolis, Ind. 46206, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Scheifinger, Curtis Coats, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Maidonerityksen parantamismenetelmä.

Förfarande för förbättring av laktation.

Maidonerityksen parantamismenetelmä

Sekä virginiamysiini- että elfamysiiniantibioottisuvut edustavat melko pieniä ja homogeenisia kemiallisten aineiden ryhmiä, joilla on mielenkiintoinen biologinen aktiivisuus. Yhdisteitä tuotetaan streptomyces- tai actinoplanes-lajeihin kuuluvien mikro-organismien fermentaatiolla. Kaikki virginiamysiiniryhmän antibiootit voidaan jakaa kuuluviksi jompaankumpaan kahdesta primäärisestä peruskenteestä, jotka tunnetaan A:na ja B:nä. Cocito esittää laajan katsauksen virginiamysiiniantibioottien rakenteesta ja vaikutusmekanismeista julkaisussa Microbiological Reviews 43 (1979) s. 145-198. Maehr et al. tarkastelevat muutamia elfamysiinejä julkaisussa Journal of Antibiotics 15 361 (1979).

Vaikka virginiamysiinejä ja elfamysiinejä on pääasiallisesti käytetty bakteeri-infektioiden hoidossa, ne on myös havaittu hyödyllisiksi kotieläinten kasvun edistämässä. Kuten Lucas on huomauttanut julkaisussa Proc. Nutr. Soc. 31 (1972) s. 1-8, virginiamysiinejä käytetään sekä siipikarjan että sikojen kasvun edistäjinä. Virginiamysiinejä on myös käytetty rehun lisäaineiden muodossa kasvun edistämisen aikaansaamiseksi märehtijöillä, kuten lampailla ja nautakarjalla. Maehr kuvaa US-patentissa nro 4 218 560 tiettyjen elfamysiinien käyttöä kasvunedistäjinä maatalaeläimillä, nautakarja mukaan lukien.

Cocito ilmoittaa, että virginiamysiiniyhdisteet ovat tehokkaita eläinten kasvun edistäjinä siitä syystä, että ne inhiboivat suolistoflooraa, erityisesti gram-positiivisia bakteereita, jotka häiritsevät ravintoaineiden imeytymistä. Vaikka tarkkaa vaikutusmekanismia ei tunneta, on vankasti selvitetty, että tämä antibioottiluokka on tehokas useiden maatalaeläinten ravinnon imeytymisen ja kasvuvauhdin edistämässä. Niiden kaupallinen käyttö kasvun edistäjinä on erityisen suotuisaa, sillä niillä on äärimmäisen alhainen toksisuus, ne eivät akkumuloidu eläinkudoksiin, suolistoflooran resistenttien mutanttien muodostuminen

on käytännöllisesti katsoen ei-havaittavaa ja ne ovat biologisesti hajotettavissa olevia eläinulosteissa.

Vaikka virginiamysiinejä ja elfamysiinejä on käytetty kasvun stimuloimiseen märehtijöillä, joita kasvatetaan ihmisten suorittamaa kulutusta varten tarkoitettua lihan-
 5 tuotantoa varten, ei näitä antibiootteja ole tähän asti käytetty maitoa erittäväillä märehtijöillä. Nyt on keksitty, että kun niitä annetaan maitoaerittäville märehtijöille, yhdisteet eivät edistä eläimen kasvua, vaan sen sijaan aiheuttavat parannusta tuotettuun maitoon. Tyypillinen parannus johti lisääntyneeseen tuotantoon ilman vastakkaista vaikutusta maidon rasva- tai proteiinipitoisuuteen.

Tämä ravinteellinen vaste on erityisen yllättävä märehtijäeläinten rehun hyväksikäytön mekanismin kannalta
 15 katsoen. Hiilihydraatit, jotka ovat märehtijärehun pääasiallinen ravinteellinen osa, hajotetaan pötsissä pyruvaatiksi, joka puolestaan metaboloidaan asetaatiksi, propionaatiksi ja butyraatiksi. Viimeksi mainitut tunnetaan yhteisesti nimellä haihtuvat rasvahapot (VFA:t).

VFA:t imeytyvät suolesta ja niitä käytetään energiantuotantoon ja kasvuun. Tiedetään, että propionaattia voidaan käyttää hyväksi paljon tehokkaammin kuin joka asetaattia tai butyraattia. Jotkin aineista, joiden tiedetään lisäävän rehun hyväksikäytön tehokkuutta, toimivatkin tämän
 25 mukaisesti muuttamalla märehtijän fermentaatioprosessia niin, että propionaatintuotanto kasvaa asetaatin ja butyraatin kustannuksella. Aineet, jotka aiheuttavat propionaatinlisäyksen ja siihen liittyen asetaatin määrän vähene-
 30 misen, aikaansaavat sen, että märehtijät, joita kasvatetaan lihantuotantoa varten, saavuttavat enemmän painoa, ilman että ne kuluttavat enemmän rehua tai säilyttävät normaalin painomallinsa, vaikka samaan aikaan kuluttavat vähemmän rehua. Sellaiset aineet ovat tästä syystä hyvin hyödyllisiä liha-alalle.

35 Maitoaerittävien märehtijöiden, kuten lypsylehmien rehun hyväksikäytön vaatimukset ja tarkoitukset eroavat melkoisesti lihantuotantoa varten kasvatettavien märehti-

jöiden vastaavista. Pötsin VFA-tuotanto on tietysti perustavanlaatuisen tärkeä, sillä se liittyy suoraan eläimen normaaliin elatukseen sekä eläimen tuottaman maidon laatuun ja määrään. Maitoatuottavalla märeh-tijällä on maidon-
 5 tuotantoon tarvittava energia kuitenkin rajoittavin tekijä maidontuotannossa. Asetaattia tarvitaan maidon rasvan synteesiin, kun taas propionaattia käytetään hyväksi glukoosin tuottamiseksi, jota taas tarvitaan laktoosin synteesiin ja jolla myös on pienempi rooli maidon rasvan tuotannossa. Bu-
 10 tyraatti on enemmän glykogeeninen kuin lipogeeninen ja lipogeeninen puoli on epäsuora, sillä butyraatti pitää ensin hajottaa asetaattiyksiköiksi, ennen kuin se voidaan käyttää hyväksi pitkäketjuisten rasvahappojen synteesiin, so. maitorasvaan.

15 Niinpä maitoaerittävien märeh-tijöiden maidontuotannon lisäämiseksi on välttämätöntä muuttaa märeh-tijöiden fermentaatiota (so. VFA-tuotantoa), mutta ei asetaatin eikä butyraatin tuotannon dramaattisella kustannuksella. Merkitsevästi pienentyneet asetaatti- ja butyraattitasot johtavat
 20 voimakkaasti pienentyneeseen maidon rasvapitoisuuteen täten muuttaen maidontuotannon vähemmän tehokkaaksi sekä laadun suhteen että taloudellisesti (raakamaidon hinnat määräytyvät osaksi maidon rasvapitoisuuden perusteella).

Nyt on keksitty, että elfamysiini- ja virginiamysiini-
 25 niantibioottisuvut ovat tehokkaita maitoatuottavien märeh-tijöiden maidontuotannon parantamisessa ilman, että ne aiheuttaisivat vastakkaisen maidon laatuun kohdistuvan vaikutuksen. Sellainen parannus on ilmennyt siinä muodossa, että maidon tilavuus on kasvanut ilman, että rasvapitoisuus
 30 on vähentynyt. Se tosiasia, että tämä parannus voidaan toteuttaa on erityisen yllättävä ottaen huomioon Parkhurstin ja McGowanin selostus julkaisussa 1978 Ellinbank Dairy Research Institute Report, joka julkaisu tulee Australias-
 35 ta. Nämä kirjoittajat antoivat erisuuruisia annoksia monensiinia lypsylehmille. Monensiini on polyeetteriantibiootti, jota laajalti käytetään märeh-tijäin rehun hyväksikäytön tehokkuuden edistäjänä. Kirjoittajat päättelivät, että

millään tutkituilla antamismäärillä ei rasvan suhteen korjattu maidon tuotanto mitenkään eronnut käsittelemättömien kontrolloieläinten vastaavasta.

Tämä keksintö koskee menetelmää maidonerityksen parantamiseksi maitoatuottavilla märehitijöillä. Erityisesti keksintö tarjoaa menetelmän maidon tuotannon parantamiseksi maitoerittävillä märehitijöillä, joilla on kehittynyt pötsintoiminta. Menetelmä käsittää sen, että annetaan suun kautta jollekin maitoerittävälle märehitijälle tehokas määrä yhdistettä, joka on valittu virginiamysiini- tai elfamysiiniantibioottisuvuista.

Kaikki tämän keksinnön menetelmässä käytettävät yhdisteet ovat alalla ennestään tunnettuja. Monia on kaupallisesti saatavissa ja käytetään bakteeri-infektioiden hoitoon eläimillä sekä kasvun stimuloimiseen kotieläimillä, kuten siipikarjalla, sioilla, lampailla ja lihanautakarjalla.

Tämän keksinnön maidonerityksen parantamismenetelmässä käytettävät yhdisteet kuuluvat niihin antibioottiluokkiin, jotka tunnetaan nimillä virginiamysiinisuku ja elfamysiinisuku. Virginiamysiinejä voidaan karakterisoida siten, että ne käsittävät makrosyklisen laktonipeptolidirakenteen kemiallisesti. Kaikki luokan jäsenet voidaan jakaa kuuluviksi jompaankumpaan kahdesta perusrakenteesta, joihin viitataan nimityksin A ja B. Antibioottiryhmän A jäsenet ovat monityydyttymättömiä syklisiä peptolideja, joilla on molekyylipaino noin 500. B-ryhmän jäsenet ovat syklisiä heksadepsipeptidejä, joiden molekyylipaino on noin 800. Koko virginiamysiiniantibioottisukua koskevan laajan katsauksen on julkaissut Cocito julkaisussa Mikrobiol. Rev. 43 (1979) s. 145-198. Katsausartikkeli on sisällytetty tähän viitteeksi antamaan kuvaa virginiamysiinisuvun jäsenistä, joita voidaan käyttää tämän keksinnön menetelmässä.

Edustaviin virginiamysiinisuvun jäseniin, joita voidaan käyttää tämän keksinnön menetelmän mukaisesti, kuuluvat dorisiini, patrisiini, vernamysiini, etamysiini, geminimysiini, synergistiini, mikamysiini, ostreogrysiini,

plaurasiini (A2315), streptogramiini, pristinamysiini, pyostasiini, virginiamysiini, viridogriseiini ja griseoviridiini.

Muiden fermentaatioalkuperää olevien tuotteiden ta-
 5 voin käsittävät monet virginiamysiinisuvun antibiootit useampia kuin yhden faktorin. Esimerkiksi virginiamysiini koostuu komponenteista, joihin viitataan nimillä virginiamysiinit M1 ja M2 sekä virginiamysiinit S1, S2, S3 ja S4. Samalla tavoin virginiamysiinityyppinen antibiootti, joka
 10 tunnetaan nimellä "A-2315" koostuu ainakin kolmesta faktorista A, B ja C (ks. US-patentti nro 3 923 980). Vernamysiini koostuu samoin faktoreista A, B ja C. Kunkin virginiamysiinityypin erillaiset faktorit ovat kaikki käyttökelpoisia tämän keksinnön menetelmässä. Niin-
 15 pä, kun tässä tekstissä viitataan johonkin tiettyyn antibioottiin, on ymmärrettävä, että tuohon termiin sisältyvät kaikki erillaiset faktorit, joita voidaan käyttää kutakin erikseen tai yhdistelmänä toistensa kanssa tai kaikkien sellaisten faktoreiden kokonaisuutena. Kaikki, mitä on
 20 välttämätöntä tämän keksinnön menetelmän harjoittamiseksi käytännössä, on se, että tehokas määrä jotakin virginiamysiinityypistä antibioottia tai jotakin elfamysiinityypistä antibioottia annetaan in vivo jollekin märehtijälle, jolla on kehittynyt pötsintoiminta ja joka on kykenevä
 25 tuottamaan maitoa.

Edullisiin virginiamysiinisuvun antibiootteihin, joita voidaan käyttää tässä menetelmässä, kuuluvat A-2315 (johon Cociton julkaisussa viitataan niellä plaurasiini tai madumysiini), virginiamysiini, griseoviridiini, vernamysiini, etamysiini, mikamysiini, ostregrysiini, viridogriseiini, streptogramiini ja pristinamysiini.
 30

Yksi erityisen edullinen menetelmä märehtijöiden maidonerityksen parantamiseksi käsittää sen, että annetaan propionaattialisäävä määrä A-2315:tä jollekin maitoaerittä-
 35 välle märehtijälle.

Elfamysiinisuvun yhdisteet ovat antibiootteja, joita saadaan streptomyces-kantojen fermentaatiolla. Elfamy-

siineistä, joita voidaan käyttää tämän keksinnön maidonerityksen parantamismenetelmässä, ovat havainnollistavia esimerkkejä X-5108, mosimysiini, efrotomysiini, A21A, atsdimysiini ja A40A.

- 5 Elfamysiiniin, joka tunnetaan nimellä X-5108, viitataan myös nimillä aurodoks ja goldinodoks. Tätä antibiootia kuvaa yksityiskohtaisesti Berger US-patentissa Re. 28 700. Useita X-5108:n estereitä, joiden sanotaan edistävän nautakarjan kasvua, julkaisee Maehr US-patentissa nro 10 4 218 560.

Mosimysiini on elfamysiini, johon viitataan myös nimillä debromysiini, kirromysiini ja Delvomysiini. Tätä yhdistettä kuvataan yksityiskohtaisesti US-patentissa nro 3 927 211.

- 15 Efrotomysiiniä kuvataan US-patentissa nro 4 065 356. Se tunnetaan lisäksi nimellä FR-02A.

20 Elfamysiiniä A21A kutsutaan myös heneikomysiiniksi ja se julkaistaan US-patentissa nro 4 175 007. Samoin viitataan A40A:han lisäksi nimellä kirrotrisiini ja sitä kuvaa yksityiskohtaisesti Mahner teoksessa "Antibiotics and other Secondary Metabolites", Academic Press, 1978.

Atsdimysiini on elfamysiiniantibiootti, jota kuvaavat Nimeck et al. US-patentissa nro 3 898 327.

- 25 Tässä selityksessä kauttaaltaan ja patenttivaatimuksissa käytettynä termi "parantunut maidoneritys" viittaa mihin hyvänsä havaittuun, jonkin virginiamysiini- tai elfamysiiniantibiootin antamisen aiheuttamaan edulliseen vaikutukseen märehittäjien maidontuotantoon. Tyypillisiin maidonerityksen paranemisiin kuuluvat varsinaiset maidon tilavuuden tuotannon lisäykset, joihin ei liity olennaisia vastakkaisia vaikutuksia maidon koostumukseen, so. rasva- ja proteiinipitoisuuteen. Meijerialan tutkimuksessa yksi tavallinen menetelmä maidontuotannon ilmaisemiseksi on termi "4 %:iin rasvaa korjattu maito" (FMC). Tämä termi yhden-
35 vertaistaa eri rasvaprosentit omaavat maidontuotannot energiaperustalta. Niinpä yksi tämän keksinnön tarjoaman parantuneen maidonerityksen ilmenemä on lisääntynyt rasva-

korjattu maidon tuotanto. Toinen tyypillinen maidonerityksen parannus on tuotetun maidon lisääntynyt voirasva- tai proteiinipitoisuus. Maidonmyyjille maksetaan palkkioita maidon kasvaneista voirasvamäärästä, josta syystä tällai-
 5 nen maidonerityksen paraneminen muuttaa maidontuotannon edullisemmaksi. Samalla tavoin on maidon proteiinipitoisuuden lisääntyminen arvokas maidonerityksen parannus, sillä jo pieni lisäys suurentaisi merkittävästi juuston määrää, joka voitaisiin valmistaa maidosta. Näitä ja sa-
 10 mantyyppisiä maidonerityksen parannuksia tarkoitetaan tässä keksinnössä.

Tämän keksinnön tarjoamaa märehtijöiden, kuten lypsylehmien ja vuohien maidonerityksen parantamismenetelmää harjoitetaan käytännössä samalla tavalla kuin menetelmiä
 15 märehtijäin rehun hyväksikäytön parantamiseksi ja märehtijäin kasvun edistämiseksi käyttäen virginiamysiini- ja elfamysiinisukujen antibiootteja. Cocito opettaa esimerkiksi, että nuorilla syöttövasikoilla, jotka saavat noin 20:stä noin 40:een grammaa jotakin virginiamysiiniä kulutetun re-
 20 hun tonnia kohti, havaitaan painonlisäysnopeuden kasvu, joka on noin 8 % - noin 12 %. Vasikoilla, jotka saivat 80 g tonnia kohti, havaittiin yli 13 %:n painonkasvu verrattuna käsittelemättömiin eläimiin.

Jotta saataisiin aikaan maidonerityksen paraneminen
 25 tämän keksinnön mukaisesti, annetaan tehokas määrä jotakin virginiamysiini- tai elfamysiiniantibioottia oraalisesti jollekin maitoaerittävälle märehtijälle. "Tehokas määrä" tässä käytettynä tarkoittaa määrää, joka annettuna in vivo jollekin maitoaerittävälle märehtijäeläimelle aiheuttaa ha-
 30 vaittavan parannuksen maidon tuotannossa, esimerkiksi tuotetun maidon tilavuuden lisäyksen noin 2 - noin 15 %:lla verrattuna käsittelemättömiin eläimiin. Sellainen annettava tehokas määrä riippuu tietenkin joukosta tekijöitä, joi-
 35 siteltävän maitoaerittävän märehtijän ikä ja koko, käytettävä virginiamysiini tai elfamysiini ja samanlaiset tekijät, joiden kanssa eläinmaatalousalan asiantuntijat taval-

lisesti joutuvat tekemisiin. Se jonkin virginiamysiinin määrä, joka on tehokas, on yleensä noin 0,1 - noin 400 mg/kg eläimen kehon painoa päivässä ja edullisemmin noin 1,0 - noin 100 mg/kg eläimen kehon painoa päivässä. Elfamysiinejä
 5 annetaan samanlaisin annoksien. Yksi keksinnön edullinen suoritustapa käsittää sen, että annetaan suun kautta noin 1,0 - noin 10,0 mg/kg/päivä A-2315:tä maitoaerittäville märehtijöille, kuten lypsylehmille.

Käsillä olevassa menetelmässä käytettäviä antibiootteja voidaan antaa maitoaerittäville märehtijöille millä
 10 hyvänä useista vaihtoehtoisista menetelmistä. Ne voidaan formuloida soveliaasta oraalista, normaalin päivittäisen rehuannoksen kautta atapahtuvaa antamista varten, veden li-
 sääaineiksi, nuolupaloiksi tai, jos halutaan, yhdisteet
 15 voidaan formuloida hitaasti vapautumisen aikaansaavien täyteaineiden, kuten polymeerien, vahojen ynnä muiden sellaisten kanssa ja antaa hitaasti vapautuvan märehtijäpelletin, kapselin, istutteen tai samanlaisen pitkitetyn vapautuksen
 laitteen muodossa, joka kykenee antamaan antibioottia pötsiin. Koska tässä menetelmässä käytettävät yhdisteet ovat
 20 fermentaatioalkuperää olevia antibiootteja, ne voidaan myös kätevästi stabiloida eläinten rehuissa käyttämistä varten marumerointiprosessilla, jota kuvataan US-patentissa nro
 4 048 268.

Tämän keksinnön menetelmää harjoitetaan edullisesti
 25 käytännössä antamalla oraalisesti jotakin antibioottia, erityisesti jotakin virginiamysiinisuvun antibioottia, jollekin maitoaerittäväälle märehtijälle normaalin rehuannoksen mukana. Esimerkiksi antibioottia A-2315 voidaan li-
 30 sätä märehtijäin rehuun määränä, joka on noin 10 - noin 30 g rehun tonnia kohti. Tässä menetelmässä käytettäviä anti-
 biootteja annetaan yleensä rehun lisäaineina määriä, jotka ovat noin 5 - noin 100 g aktiivista aineosaa rehun tonnia kohti. Yhdisteet voidaan formuloida rehuesisekoitusten
 35 muotoon kätevää eläinten normaaliin rehuannokseen lisäämistä varten. Sellaiset esisekoitusformulaatiot sisältävät noin 1 - noin 95 % painon mukaan laskettuna aktiivista

aineosaa sekoitettuna tavanomaisten kantaja-aineiden tai täyteaineiden kanssa, kuten soijajauhon, riisinkuorien, tärkkelyksen, maissijauhon ynnä muiden sellaisten kanssa.

Kuten edellä on huomautettu, yksi edullinen menetelmä maitoaerittävien märehtijöiden maidontuotannon parantamiseksi käsittää sen, että annetaan suun kautta virginiamysiinityypin antibioottia A-2315. Tämän antibiootin tekijän A on osoitettu olevan tehokas kehittyneen pötsin fermentaatioprosessin muuttamisessa sekä in vitro että in vivo -testeissä. Seuraavaa in vitro -testiä käytettiin osoitettaessa A-2315:n A-tekijän kyky lisätä pötsin propionaatin ja butyraatintuotantoa.

Pötsinestettä saadaan härkämullikasta, jolla on kirurgisesti asennettu fistula-avanne pötsiin. Härkämullikka pidetään runsasviljaisella muonalla, jonka koostumus on seuraava:

	69,96 %	karkeasti jauhettua maissia
	10,00 %	jauhettuja maissintähkiä
	8,00 %	soijajauhoa (50 % proteiinia)
20	5,00 %	alfalfa-jauhoa
	5,00 %	melassia
	0,60 %	ureaa
	0,50 %	dikalsiumfosfaattia
	0,50 %	kalsiumkarbonaattia
25	0,30 %	suolaa
	0,07 %	vitamiinien A ja D ₂ esisekoitusta ^x
	0,05 %	vitamiinin E esisekoitusta ^{xx}
	0,03 %	hivenmineraaliesisekoitusta ^{xxx}

^xSisältää 453,5 g (1 lb) kohti: 2 000 000 I.U. vitamiinia A, 227 200 I.U. vitamiinia D₂ ja 385,7 g soijapurehua, johon on lisätty 1 % öljyä.

^{xx}Maissiviinanpolttimon kuivattuja jyviä, joiden liukoiset aineet sisältävät 20 000 I.U. d- α -tokoferyyliasetaatia 453,6 g (1 lb) kohti.

^{xxx}Sisältää mangaanioksidia, kaliumjodidia, kobolttikarbonaattia, kuparioksidia ja sinkkisulfaattia.

Pötsinestenäyte siivilöidään neljän juustokangas-
kerroksen läpi ja suodos kerätään. Juustokankaan pidättämä
partikkelimainen aine suspendoidaan uudelleen riittävään
määrään fysiologista puskuria, jotta se palautuu pötsines-
teen alkuperäiseen tilavuuteen ja tämä suspensio siivilöi-
dään taas. Käytettävällä puskurilla on seuraava koostumus:

	g/litra	aineosa
	0,316	NH_2HPO_4
	0,152	KH_2PO_4
10	2,260	NaHCO_3
	0,375	KCl
	0,375	NaCl
	0,112	MgSO_4
	0,050	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
15	0,008	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	0,004	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
	0,004	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	0,002	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
	0,001	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

20 kuten ovat kuvanneet Cheng et al. lehdessä J. Dairy Sci.
38 (1955) 1225-1230.

Kaksi filtraattia yhdistetään ja niiden annetaan
seisoa, kunnes partikkelimainen aine erottuu yläosaan. Kir-
kas kerros eristetään, laimennetaan samalla puskurilla
25 (1:1) ja säädetään sitten pH:hon 7,0.

Laimennettu pötsineste (10 ml) pannaan 25 ml:n pul-
loon, jossa on 40 mg edellä kuvattua rehua, lisäksi 5 mg
soijapapuproteiinia ja testiyhdiste. Kullekin käsittelylle
käytetään neljää rinnakkaispulloa. Lisäksi käytetään kahta
30 neljän kontrollipullon sarjaa. Nollahetken kontrollia ja
inkuboitavaa 16 tunnin kontrollia käytetään. Kaikkia tes-
tipulloja inkuboidaan 16 tuntia 38°C :ssa. Inkuboinnin jäl-
keen lisätään kuhunkin pulloon 25-%:ista metafosforihappoa
(2 ml). Näytteiden annetaan asettua ja supernatantti ana-
35 lysoidaan kaasukromatografian avulla propionaatti-, ase-
taatti- ja butyraattiyhdisteiden suhteen.

Testiyhdisteiden tuloksia verrataan tilastollisesti kontrollien tuloksiin. Alla oleva taulukko osoittaa käsiteltyjen pullojen haihtuvien rasvahappojen (VFA) konsentraatioiden suhteen kontrollipullojen konsentraatioihin.

Taulukko I

A-2315:n A-tekijän vaikutus pötsin VFA:han in vitro

ug A-2315-A:ta laimennetun pötsi- nesteen ml kohti	A-2315:n A-tekijän vaikutus pötsin VFA:han in vitro			
	Asetaatti	Butyraatti	Propionaatti	Kokonais-VFA
1,0	0,95	1,04	1,15	1,05
0,3	0,95	1,00	1,08	1,07
0,1	0,97	1,01	1,07	1,04
0,0	1,00	1,00	1,00	1,00

In vivo -koe, joka oli suunniteltu osoittamaan A-2315A:n kyky lisätä propionaattia ja butyraattia kehittyneessä pötsissä suoritettiin maitoa erittämättömillä lam-pailla.

- 5 Kahdelle ryhmälle fistuloituja karitsoja annetaan jonkin verran enemmän kuin niiden normaali rehuannos 17 päivän ajan. Yhdelle ryhmälle annetaan testiyhdistettä rehussa g/tonni-perustalla.

- Kummankin eläinryhmän pötsinesteistä otetaan näyt-
10 teitä käsittelyjakson päivinä 3, 7, 10, 14 ja 17.

- Pötsinäytteiden fermentaatio pysäytetään lisäämällä metafosforihappoa. Kukin näyte laimennetaan, sentrifugoidaan käyttäen 2 000 x painovoima 10 minuuttia, pintanesteistä analysoidaan haihtuvat rasvahapot kaasukromatografi-
15 sella menetelmällä, jonka ovat esittäneet E.S. Erwin, G.J. Marco ja E.M. Emery lehdessä J. Dairy Sci. 44 (1966) 1768. Pötsin haihtuvien rasvahappojen mooliprosentit lasketaan ja vaikutus mitataan vertaamalla propionihapon ja voi-hapon mooliprosenttisuuksia käsitellyissä eläimissä samanaikaisten
20 ten kontrollien vastaaviin. Testin tulokset esitetään alempana taulukoissa II ja III.

Taulukko II

A-2315:n A-tekijän vaikutus pötsin VFA:han in vivo

Käsittely	Määrä	Eläinten lukumäärä	Propionihapon konsentraatio	Muutos kontrolliin verrattuna	Kasvu suhteessa kontrolliin
A-2315	g/tonni	6	31,0	4,8	18,2 %
A-tekijä					
Kontrolli		6	26,2	0	0

Taulukko III

A-2315:n A-tekijän vaikutus pötsin VFA:han in vivo

Käsittely	Määrä	Eläinten lukumäärä	Voihapon kon- sentraatio %	Muutos kontrol- lin verrattuna	Kasvu suhteessa kontrolliin
A-2315	15 g/tonni	6	13,5	2,4	21,6 %
A-tekijä					
Kontrolli		6		11,1	

Tämän keksinnön käytäntö selvenee lisää seuraavista yksityiskohtaisista esimerkeistä.

Esimerkki 1

Seuraava sekoitus on tyypillinen tämän keksinnön soveltamisessa maitoa erittäville märehitijöille annettava rehuaine.

	Aineosa	% painon mukaan
	maissi	32,15
	ohra	10,0
10	melassi	7,5
	kaura	10,0
	soijapapuöljyjauho (48 % proteiinia)	13,8
	sokerijuurikassose	2,5
	maissigluteenirehu	12,5
15	viinanpolttimovilja	7,5
	hivenmineraalisekoitusta	0,05
	suola	1,0
	dikalsiumfosfaatti	2,0
		100,0

20 Yllä olevat aineosat sekoitetaan yhtenäiseksi seokseksi ja sitten lisätään jotakin elfamysiini- tai virginiamysiini-antibioottia, kuten A-2315:tä 30 g:n määrä rehun tonnia kohti. Seos sekoitetaan perusteellisesti ja sitä syötetään maitoaerittäville märehitijöille, kuten lypsylehmille ad libitum, jotta saadaan maidon tilavuuden lisäys, joka on

25 noin 4-10 %, ilman että maidon voirasvapitoisuus samanaikaisesti laskee.

Esimerkki 2

30 Toinen tyypillinen runsasproteiininen dieetti maitoaerittäville märehitijöille on seuraava sekoitus.

	Aineosa	% painon mukaan
	jauhettu maissintähkä	35,0
	kuivattu alfalfa-jauho	20,0
	jauhettu maissi	19,3
5	sokeriruokomelassi	12,0
	soijapapuöljyjauho (48 % proteiinia)	12,0
	dikalsiumfosfaatti	1,0
	joditettua suolaa	0,5
	hivenmineraalisekoitus	0,17
10	vitamiinien A ja D ₃ esisekoitus	0,02
	maissiöljy	0,01
		100,00

Aineosat sekoitetaan tasaiseksi seokseksi ja sitten jotakin virginiamysiiniantibioottiesisekoitusta, joka käsittää 30 g
 15 A-2315A:ta sekoitettuna yhteen 453,6 g:n (1 lb:n) kanssa
 jauhettua maissintähkää, sekoitetaan rehuannoksen kanssa
 siten, että lopullinen formulaatio sisältää noin 30 g
 A-2315A:ta rehun tonnia kohti. Rehu annetaan sitten lypsy-
 eläimille ad libitum, jotta saadaan maidon tuotannon kasvu,
 20 joka on noin 4 - noin 10 %.

Virginiamysiinien kyky parantaa maidoneritystä maito-
 toaerittäväillä märehitijöillä on osoitettu in vivo -testissä,
 jossa käytettiin 30 Holstein-hiehoa. Eläimet olivat noin
 2 1/2 vuotta vanhoja, painoivat likimain 544 kg (1 200 lb)
 25 silloin, kun testi alettiin ja yleensä niillä oli noin 18
 viikkoa laktaatioon. Testi noudatti 2 x 3 -faktoriaalista
 suunnitelmaa ja koostui 10-viikkoisesta käsittelyajasta,
 joka seurasi alustavaa 2-viikkoista sopeutusajanjaksoa. Ku-
 kin eläin toimi koeyksikkönä.

30 Eläimet jaettiin kahteen pääryhmään, joissa oli kum-
 massakin 15 eläintä. Kaikille toisen ryhmän eläimille syö-
 tettiin dieettiä, joka koostui 50 % (perustana kuivan ai-
 neen paino) maissipainorehusta ja 50 % proteiinikonsentraa-
 tista, jossa oli 19,9 % proteiinia ja joka koostui seuraa-
 35 vista aineosista:

	Aineosat	Paino-%
	maissi, jauhettu keltainen	63,2
	soijajauho	21,9
	kuivattu panimovilja	10,0
5	kalkkikivi	2,5
	mononatriumfosfaatti	0,9
	vitamiini-AD-esisekoitus ^a	0,35
	vitamiini-E-esisekoitus ^b	0,10
	Se-esisekoitus ^c	0,05
10	hivenmineraalisuola ^d	1,0

^aKukin esisekoituksen 453,6 g (1 lb) sisältää 2×10^6 USP-yksikköä A-vitamiinia ja $2,25 \times 10^5$ USP-yksikköä D₃-vitamiinia.

15 ^bKukin esisekoituksen 453,6 g (1 lb) sisältää 2×10^4 I.U. E-vitamiinia.

^cKukin esisekoituksen 453,6 g (1 lb) sisältää 91 mg seleeniä.

20 ^dHivenmineralisoitu suola sisältää 95-98 % suolaa, 0,28 % mangaania mangaanioksidina, 0,007 % jodia kalsiumperjodaattina, 0,007 % kobolttia kobolttikarbonaattina, 0,035 % kuparia kuparioksidina, 0,35 % sinkkiä sinkkioksidina, 0,17 % rautaa rautaoksidina.

25 Toiselle 15 testieläimen ryhmälle annettiin dieettiä, jossa oli 75 % (perustana kuivan aineen paino) maissipainorehua ja 25 % konsentraattia, jossa oli 33,5 % proteiinia ja jolla oli seuraava koostumus:

	Aineosat	Paino-%
	maissi, jauhettu keltainen	15,85
30	soijajauho	50,15
	kuivattu panimovilja	20,0
	melassi	5,0
	kalkkikivi	4,15
	mononatriumfosfaatti	1,85
35	vitamiini-AD-esisekoitus ^a	0,70
	vitamiini-E-esisekoitus ^b	0,20
	Se-esisekoitus ^c	0,10
	hivenmineraalisuola ^d	2,0

^aKukin esisekoituksen 453,6 g (1 lb) sisältää 2 x 10⁶ USP-yksikköä A-vitamiinia ja 2,25 x 10⁵ USP-yksikköä D₃-vitamiinia.

^bKukin esisekoituksen 453,6 g (1 lb) sisältää 2 x 10⁴ I.U. E-vitamiinia.

^cKukin esisekoituksen 453,6 g (1 lb) sisältää 91 mg seleeniä.

^dHivenmineralisoitu suola sisältää 95-98 % suolaa, 0,28 % mangaania mangaanioksidina, 0,007 % jodia kalsiumperjodaattina, 0,007 % kobolttia kobolttikarbonaattina, 0,035 % kuparia kuparioksidina, 0,35 % sinkkiä sinkkioksidina, 0,175 % rautaa rautaoksidina.

Kummassakin kahdesta 15 eläimen ryhmästä käytettiin viittä eläintä kontrolleina eivätkä ne saaneet mitään anti-bioottia. Viisi kummankin ryhmän eläintä sai päivittäisen annoksen 400 mg/eläin virginiamysiiniä A2315 ja loput viisi eläintä saivat 800 mg/eläin/päivä A2315:tä. Kaikissa tapauksissa annettiin A2315 suun kautta sekoittamalla se 907 g:aan (2 lb) päivittäisen rehuannoksen päällimmäistä kerrosta.

Maidon tuotanto ja rehun otto merkittiin muistiin päivittäin. Maidon koostumus määritettiin viikoittain läpi koko tutkimuksen. Pötsinäytteitä kerättiin joka toinen viikko ja niistä analysoitiin VFA-koostumus. Tutkimuksen tulokset esitetään seuraavissa taulukoissa.

Taulukko IV

Maidon tuotanto (kg/päivä)

A2315:n annostus (mg/eläin/päivä)

		0	400	800
5	Maitoaerittäviä märeh- tjöitä, joiden dieettinä oli:			
	50 % maissipainorehua >	18,51	20,28	19,69
	50 % konsentraattia			
10	:-nen muutos käsittelemät- tömmään kontrolliin ver- rattuna		9,6	6,4
	Maitoaerittäviä märeh- tjöitä, joiden dieettinä oli:			
15	75 % maissipainorehua >	18,37	18,14	18,55
	25 % konsentraattia			
	:-nen muutos käsittelemät- tömmään kontrolliin verrat- tuna		-1,3	1,0

20 Taulukko V

Maidon koostumus (% maitorasvaa)

A2315:n annostus (mg/eläin/päivä)

		0	400	800
	Maitoaerittäviä märeh- tjöitä, joiden dieettinä oli:			
25	50 % maissipainorehua >	3,25	3,30	3,27
	50 % konsentraattia			
	75 % maissipainorehua >	3,66	3,69	3,54
30	25 % konsentraattia			

Taulukko VI

Maidon koostumus (% proteiinia)

		A2315:n annostus (mg/eläin/päivä)		
Muona		0	400	800
5	50:50	3,53	3,45	3,46
	75:25	3,48	3,48	3,45

Taulukko VII

Pötsin VFA-konsentraatiot eläimillä, joiden dieetti-
nä oli 50:50 maissipainorehu/konsentraatti

		Haihtuvia rasvahappoja			
A2315:n annos		(mooli-%)			Kokonais-
mg/eläin/päivä		Asetaatti	Propionaatti	Butyraatti	VFA:t
		mmol/litra			
	0	62,4	23,9	13,0	60,1
15	400	60,9	22,9	16,1	54,9
	800	61,3	23,5	15,3	58,3

Taulukko VIII

Pötsin VFA-konsentraatiot eläimillä, joiden dieettinä
oli 75:25 maissipainorehu/konsentraatti

		Haihtuvat rasvahapot (mooli-%)			Kokonais-
A2315:n annos		Asetaatti	Propionaatti	Butyraatti	VFA:t
mg/eläin/päivä		mmol/litra			
	0	65,8	22,0	12,3	60,4
	400	64,8	20,4	14,8	55,4
25	800	65,6	19,1	15,3	52,2

Patenttivaatimukset:

1. Maitoaerittävän märeh-tijän maidonerityksen paran-
tamismenetelmä, t u n n e t t u siitä, että siinä annetaan
5 oraalisesti jollekin märeh-tijälle, jolla on kehittynyt pöt-
sin toiminta, tehokas määrä jotakin antibioottia, jolle on
tunnusomaista, että se on virginiamysiini- tai elfamysiini-
antibioottisuvun jäsen.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n -
10 n e t t u siitä, että siinä käytetään virginiamysiiniantibi-
oottia, joka on valittu dorisiin, patrisiin, vernomy-
siinin, etamysiinin, geminimysiinin, synergistiinin, mika-
mysiinin, ostreogrysiinin, plaurosiinin (A-2315:n), strep-
togramiinin, pristinamysiinin, pyostasiinin, virginiamysii-
15 nin, viridogriseiinin ja griseoviridiinin joukosta.
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että siinä käytetty antibiootti on valittu
A-2315-antibioottikompleksin tai sen yksittäisten tekijöiden
joukosta.
- 20 4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että siinä käytetty antibiootti on A-2315-
kompleksi.
5. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että siinä käytetty antibiootti on A-2315A.
- 25 6. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että siinä käytetty antibiootti on virgi-
niamysiini M1 tai virginiamysiini M2.
7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että siinä käytetään elfamysiiniantibioot-
30 tia, joka on valittu mosimysiinin, aurodoksin (X-5108:n),
efrotomysiinin, A21A:n, A40A:n ja atsdimysiinin joukosta.
8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että siinä käytetään X-5108:aa.
9. Virginiamysiini- tai elfamysiinisuvun antibiootti
35 käytettäväksi maidonerityksen parantamiseen jollakin märeh-
tijällä, jolla on kehittynyt pötsin toiminta.

Patentkrav:

1. Förfarande för förbättrande av mjölkavsöndringen hos en mjölkgivande idisslare, k ä n n e t e c k n a t
 5 därav, att en idisslare med utvecklad vomfunktion oralt administreras en effektiv mängd av ett antibiotikum som utmärks av att det är en medlem antibiotikafamiljen virginiamycin eller elfamycin.
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
 10 t e c k n a t därav, att man använder ett virginiamycin-antibiotikum som valts bland doricin, particin, vernomycin, etamycin, geminimycin, synergistin, mikamycin, ostreogrycin, plaurocin (A-2315), streptogramin, pristinamycin, pyostacin, virginiamycin, viridogrisein och griseoviridin.
3. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e -
 15 t e c k n a t därav, att det använda antibiotikumet valts bland antibiotikumkomplexet A-2315 eller de individuella faktorerna därav.
4. Förfarande enligt patentkravet 3, k ä n n e -
 20 t e c k n a t därav, att det använda antibiotikumet är komplexet A-2315.
5. Förfarande enligt patentkravet 3, k ä n n e -
 t e c k n a t därav, att det använda antibiotikumet är A-2315A.
6. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e -
 25 t e c k n a t därav, att det använda antibiotikumet är virginiamycin M1 eller virginiamycin M2.
7. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
 30 t e c k n a t därav, att det använda antibiotikumet valts bland mocimysin, aurodox (X-5108), efrotomycin, A21A, A40A och azdimycin.
8. Förfarande enligt patentkravet 7, k ä n n e -
 t e c k n a t därav, att det använda antibiotikumet är X-5108.
9. Antibiotikum ur virginiamycin- eller elfamycin-
 35 familjen för användning vid förbättrande av mjölkavsöndringen hos en idisslare med utvecklad vomfunktion.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökringe

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI

CH

DE H 2.753.309 (A23K 1/17), H 2.725.163 (C07D 493/04)

DK

FR

GB

NO

SE

US P 4.218.560 (C07 H 7/06), P 3.923.980 (A61K 35/00)

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP H 19.809 (A23K 1/16)

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Maija Tamminen

Allekirjoitus