



PATENTDIREKTORATET  
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 3660/84

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> C 07 H 19/01  
C 12 P 19/60  
A 23 K 1/17

(22) Indleveringsdag: 26 jul 1984

(41) Alm. tilgængelig: 29 jan 1985

(44) Fremlagt: 15 okt 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(83) Deponering af mikroorganismer

(30) Prioritet: 28 jul 1983 US 518233

(71) Ansøger: \*F. Hoffmann-La Roche AG; Grenzacherstrasse 124; 4002 Basel, CH

(72) Opfinder: Chao-Min \*Liu; US, John \*Westley; US

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau

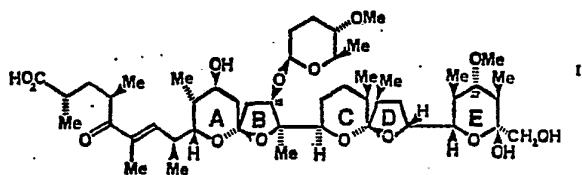
(54) Ionophort polyetherantibiotikum, fremgangsmåde til fremstilling heraf, præparat indeholdende forbindelsen samt anvendelsen af denne som foderudnyttelsesforøgende middel

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

3660-84

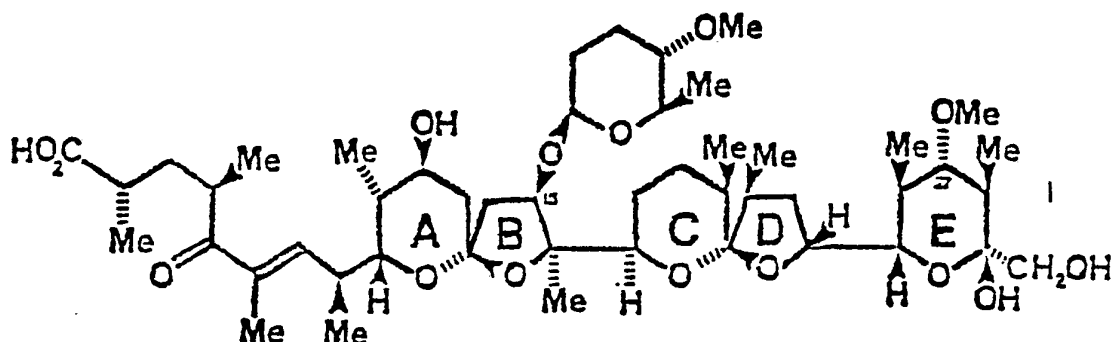
Et hidtil ukendt ionophort polyether-antibiotikum med formlen I



og salte deraf kan fremstilles ved dyrkning af en stamme af Streptomyces X-14934, påfølgende isolering af forbindelsen fra dyrkningsvæsken og eventuelt dannelse af et salt deraf.

Forbindelsen med formlen I og salte deraf har virkning som antibakterielt middel og som anticoccidialt middel.

Den foreliggende opfindelse angår et hidtil ukendt ionophort polyetherantibiotikum benævnt antibiotikum X-14934A, med formelen I



5 eller salte deraf med baser.

Forkortelsen "Me" betegner methyl.

Forbindelsen med formelen I og salte deraf med baser har virkning som antibakterielt middel og som anticoccidialt middel.

Antibiotikum X-14934A er den betegnelse, der er givet et krystallinsk  
10 antibiotikum, der er dannet af en streptomycycesorganisme, af hvilken lyofiliserede prøver i overensstemmelse med Budapesttraktaten er deponeret i U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Northern Regional Research Laboratories (NRRL), Peoria, Illinois. Kulturen har af NRRL fået identifikationsnummer NRRL 15518.

15 Antibiotikum X-14934A er et polyetherantibiotikum og danner mange forskellige salte med baser. Disse salte fremstilles ud fra den frie syreform af antibiotikummet ved metoder, der er velkendte inden for området med forbindelser af polyethertypen; fx ved at vaske den frie syre i opløsning med en egnet base eller et egnet basisk salt. Ek-  
20 sempler på sådanne basiske stoffer, der kan danne salte ifølge den foreliggende opfindelse, omfatter alkalimetalbaser såsom natriumhydroxid, kaliumhydroxid og lithiumhydroxid; jordalkalimetalbaser såsom calciumhydroxid og bariumhydroxid; og ammoniumhydroxid. Alkali-

metal- eller jordalkalimetalsalte, der er egnede til dannelse af salte, kan omfatte anioner såsom carbonater, hydrogencarbonater og sulfater.

5 Eksempler på organiske baser, der danner salte med polyetherforbindelserne, er lavere primære, sekundære og tertiære alkylaminer og hydroxyalkylaminer, fx ethylamin, isopropylamin, diethylamin, methyl-  
n-methylamin, ethanolamin og diethanolamin.

Opfindelsen angår endvidere en fremgangsmåde til fremstilling af forbindelsen med formel I eller et salt deraf med en base, hvilken  
10 fremgangsmåde er ejendommelig ved, at stammen *Streptomyces* X-14934 NRRL 15518 dyrkes i en vandig carbonhydratopløsning indeholdende et nitrogenholdigt næringsmiddel under submerse aerobe betingelser, hvorefter forbindelsen med formel I isoleres fra denne opløsning og  
15 der, om ønsket, dannes et salt af forbindelsen med formel I med en base; endvidere et coccidiostatikum eller foderudnyttelsesforøgende præparat indeholdende en virksom mængde af en forbindelse med formel I eller et salt deraf med en base samt anvendelsen af en forbindelse med formel I eller et salt deraf med en base som et foderudnyttelsesforøgende middel.

20 Stammen af *Streptomyces* X-14934 NRRL 15518 har følgende karakteristika:

1. *Mikroskopiske karakteristika.* Kulturen X-14934 vokser i agarmedier med forskellig sammensætning og danner et submers mycelium, som  
25 trænger ind i agaren og ikke fragmenterer ved ældning, og et luftmycelium, som differentieres partielt i sporekæder. Disse kæder har spiralform og har mere end 10 sporer hver. Sporerne kan ikke ses individuelt på grund af en skede, der dækker hele kæden og bliver rynket ved dehydratisering. Sporerne er glatte, og de måler i gennemsnit  $0,6 \times 1,1 \mu\text{m}$ .

30 Papirchromatografisk analyse af hydrolysater af hele celler viser forekomst af LL-diaminopimelinsyre, hvilket bekræfter identifikationen af denne organisme som en stamme af slægten *Streptomyces*.

2. *Makroskopiske karakteristika.* I nedenstående tabel er angivet karakteristika for vækst, sporedannelsesgrad og farve på massen i luften og på bagsidemyceliet i forskellige medier. De angivne data er optegnet efter 14 dages inkubation ved 28°C.

5	Medium	Vækst og sporedannelsesgrad	Farve på luftmassen (1)	Farve på bagsidemyceliet (1)
10	Gær-malteks-trakt (ISP-2)	kraftig vækst; ingen sporedannelse	østershvid (b)	stråfarvet (2 fb)
15	Havremels-agar (ISP-3)	kraftig vækst; hygroskopisk; god sporedannelse	beige-brun (3 ig) med hvide pletter	sølvgrå (3 fe) med hvide pletter
20	Uorganiske salte-stivelsesagar (ISP-4)	kraftig vækst og god sporedannelse	sølvgrå (3 fe)	lysegul (1 1/2 fb)
25	Glycerol-asparagin-agar (ISP-5)	ringe vækst; ringe sporedannelse	hvid (a)	hvid (a)

(1) Farvekoden er fra Color Harmony Manual 4th edition, Container Corporation of America, 1958.

3. *Fysiologiske karakteristika.* Stammen X-14934 udnytter glucose, L-arabinose, saccharose, isoinositol, mannitol, fructose, rhamnose og raffinose og, mindre effektivt, xylose som eneste carbonkilde til vækst. Celluloseudnyttelsen er negativ.
- 30 Produktion af H<sub>2</sub>S, vist ved mørkfarvning i pepton-gærekstrakt-jernagar (ISP 6) er positiv, og en mørk farve (melanin) udvikler sig i tyrosinholdigt medium (ISP 7). Nitratreduktion er negativ. Gelatine-, stivelses- og caseinhydrolyse er positiv. Der er ingen vækst ved NaCl-koncentrationer på 3,5% eller derover.

4. *Sammenligning med kendte streptomycesarter.* På basis af farven på sporemassen, formen af sporekæderne, sporeoverfladen og produktionen af melanoid-pigmenter såvel som koloniernes hygroskopiske karakter på nogle medier og carbonkildeudnyttelsestests kan stamme X-14934 henføres til arten *Streptomyces hygroscopicus*.

*Streptomyces* X-14934, som her er beskrevet, omfatter alle stammer af *Streptomyces*, som danner en forbindelse beskrevet i nærværende ansøgning, og som ikke definitivt kan skelnes fra stammen NRRL 15518 og dens subkulturer, herunder mutanter og varianter med væsentlig samme egenskaber. Forbindelsen ifølge opfindelsen er beskrevet her, og efter at denne identifikation er kendt, er det let at skelne de stammer, der producerer denne forbindelse, fra andre.

Når *Streptomyces* X-14934 dyrkes under egnede betingelser, danner den antibiotikum X-14934A. En fermentationsvæske indeholdende *Streptomyces* X-14934 fremstilles ved at pøde sporer eller mycelier af den organisme, der producerer antibiotikumet, i et egnet medium og derefter dyrke det under aerobe betingelser. Til fremstilling af antibiotikumet er dyrkning på et fast medium muligt, men til fremstilling i store mængder foretrækkes dyrkning i et flydende medium. Dyrkningstemperaturen kan varieres inden for et bredt område, mellem 20 og 35°C, inden for hvilket organismen kan gro, men der foretrækkes en temperatur på 26-30°C og en i det væsentlige neutral pH-værdi. Til den submerse aerobe fermentation af organismen til fremstilling af antibiotikum X-14934A indeholder mediet som carbonkilde hensigtsmæssigt et carbonhydrat såsom glycerol, glucose, maltose, lactose, dextrin, stivelse, etc., i ren eller rå tilstand, og som nitrogenkilde fx et organisk materiale såsom sojabønne, destillationsremanenser, jordnøddemel, bomuldsfrømel, kødekstrakt, pepton, fiskemel, gærekstrakt, majsstøbevand, etc., og om ønsket uorganiske nitrogenkilder såsom nitrater og ammoniumsalte og mineralsalte såsom ammoniumsulfat, magnesiumsulfat, etc. Mediet kan også indeholde natriumchlorid, kaliumchlorid, kaliumphosphat og lignende og pufferstoffer såsom natriumcitrat, calciumcarbonat eller phosphater og spormængder af tungmetalsalte. Ved beluftet submers dyrkning anvendes et antiskummiddel såsom flydende paraffin, fede olier eller siliconeforbin-

delser. Der kan anvendes mere end én type carbonkilde, nitrogenkilde eller anti-skummiddel til fremstilling af antibiotikum X-14934A.

5 Antibiotikum X-14934A har i form af natriumsalt-monohydratet en toxicitet ( $LD_{50}$ -værdi) i mus på 25 mg/kg peroralt og 7,75 mg/kg intraperitonealt.

De coccidiostatiske præparater ifølge opfindelsen, der som aktiv bestanddel indeholder krystallinsk antibiotikum X-14934A eller salte deraf eller den tørrede, ufiltrerede fermentationsvæske, fremstilles ved at blande den aktive bestanddel med en inert bestanddel. Den 10 inerte bestanddel kan indeholde et foderstof, fortyndingsmidler, etc. Ved udtrykket "inert bestanddel" menes et materiale, der ikke virker som antiparasitisk middel, fx en coccidiostat, som er uvirksom med hensyn til den aktive bestanddel, og som uden fare kan indtages af de dyr, der skal behandles, og således er et inert materiale et sådant, som er inaktivt til den foreliggende opfindelses formål. 15

Når den aktive bestanddel administreres oralt til fjerkræ, der kan angribes af coccidiose, især kalkuner og kyllinger, som en del af foderet, bekæmper det effektivt sygdommen ved enten at forebygge den eller helbrede den efter dens udbrud. Endvidere opretholder det 20 behandlede fjerkræ vægten eller forøger den faktisk i sammenligning med kontroldyr. Således ikke alene bekæmper præparaterne ifølge opfindelsen coccidiose, men medvirker også til at forbedre effektiviteten af foderets omsatning til vægtforøgelse.

Den aktuelle koncentration af den virksomme bestanddel i dyrefodet 25 kan naturligvis indstilles efter de individuelle behov og kan variere inden for et bredt område. De begrænsende faktorer for koncentrationen er, at den minimale koncentration skal være sådan, at der fås en tilstrækkelig mængde aktiv bestanddel til at bevirke den ønskede bekæmpelse af coccidiose, og at den maksimale koncentration er sådan, 30 at den indtagne mængde præparat ikke giver uheldige eller uønskede bivirkninger.

Således indeholder fx en foderpræmix eller et fuldfoder en tilstrækkelig mængde aktiv bestanddel til at udgøre fra ca. 1 ppm til ca. 20

ppm (beregnet på vægt) af det daglige foderforbrug. Der anvendes fortrinsvis ca. 10-15 ppm (beregnet på vægt). Generelt er ca. 1 - ca. 15 ppm aktiv bestanddel tilstrækkeligt til at bekæmpe coccidiose. Større mængder end 20 ppm giver, selv om de er virksomme mod coccidiose, generelt ikke bedre resultater i forhold til det foretrukne ppm-område, og har i nogle tilfælde ugunstig indvirkning på væksten, foderudnyttelsen og mortaliteten.

Det optimale dosisniveau varierer naturligvis efter dyrets størrelse. Når antibiotikum X-14934A ifølge opfindelsen anvendtes til behandling eller forebyggelse af coccidiose, kan det først tilsættes eller blandes med en foderbestanddel eller et bærestof til dannelsen af en foderadditivpræmix, et foderkoncentrat eller et foderadditivsupplement. Et foderadditiv, et koncentrat eller en præmix skal fortyndes til dannelsen af et fuldfoder, dvs. det materiale, der administreres som eneste ration. Et foderadditivsupplement er et stof, der skal konsumeres direkte af et dyr, eller som kan fortyndes yderligere til dannelsen af et fuldfoder eller kan indtages og anvendes som et supplement til andre rationer. Foderadditivsupplement, koncentrat og præmix indeholder en relativt stor procentdel coccidiostat, dvs. den aktive bestanddel, og fremstilles bekvemt ved at sætte den aktive bestanddel til et egnet bærestof og blande det på en måde, som giver en i det væsentlige ensartet fordeling af coccidiostaten i bærestoffet. Egnede bærestoffer er faste stoffer, som er inerte i forhold til den aktive bestanddel, og som trygt kan indtages af de dyr, der skal behandles. Typiske sådanne bærestoffer er kommercielle fjerkræfoderstoffer, formalede kornprodukter, kornbiprodukter, planteproteinkoncentrater, (soja, jordnødder, etc.), fermentationsbiprodukter, salt, kalk, uorganiske forbindelser, etc. eller blandinger deraf. Flydende dispersioner kan fremstilles ved at anvende vand eller vegetabilsk olie, fortrinsvis omfattende et overfladeaktivt middel, en emulgator eller lignende i en flydende dispersion, fx ethylendiamintetraeddikesyre, etc., og opløselighedsfremmende stoffer. Et hvilket som helst egnet bærestof eller fortyndingsmiddel kan fungere som inert bestanddel i den faste form af det antiparasitiske middel, når blot det er inert over for den aktive bestanddel og er ikke-toxisk for det dyr, hvortil det skal administreres.

Den aktive bestanddel kan blandes til en mos, en pellet eller en hvilken som helst ønsket konfiguration med det inerte bærestof eller det faste fortyndingsmiddel ved en hvilken som helst bekvem teknik. Fx kan der dannes præparater ved at fintformale eller pulverisere den aktive bestanddel og den inerte bestanddel under anvendelse af en kommercielt tilgængelig mølle eller pulverisator, med eller uden tilstedeværende foderstof. Hvis foderstoffet ikke forekommer, når formalingen eller pulveriseringen foretages, kan det resulterende stof fordeles i et hvilket som helst bekvemt tilgængeligt foderstof.

10 Typiske fjerkræfoderstoffer, der kan præpareres med den aktive bestanddel ifølge opfindelsen, kan indeholde flere bestanddele, idet de fx kan indeholde højenergi-kornprodukter såsom majs, hvede, "wheat red dog"-mel, milokorn eller havremel; kornprodukter med middelhøj eller lav energi såsom havre, byg, hvedemel, "middlings" eller standard-"middlings"; stabiliserede fedtstoffer; vegetabilsk protein såsom sojabønne- eller majs-glutenmel eller jordnøddemel; animalsk protein såsom fiskemel, fiskehydrolysat eller kødafpuds; UGF ("unidentified growth factor")-kilder og andre B-vitaminbærere såsom tør-mælksprodukter, tørret ølgær, tørrede destillationsremanenser eller fermentationsremanenser; dehydratiseret alfalfamel; og forskellige specielle additiver såsom yderligere riboflavin, vitamin B<sub>12</sub>, calciumpantothenat, niacin, cholin, vitamin K eller vitamin E, samt stabiliseret vitamin A, vitamin D<sub>3</sub> (D-aktiverede animalske steroler); calcium- og phosphorsupplementer såsom dicalciumphosphat, dampbehandlet benmel, defluoreret phosphat eller kalk; ioderet salt, mangansulfat, zinkcarbonat eller et antibiotisk fodersupplement; methionin eller hydroxyanaloge dertil og en antioxidant.

Som det fremgår ovenfor, er de coccidiostatisk præparater beregnet til oral indtagelse. De kan sættes til det behandlede dyrs normale foderforsyning eller administreres på anden måde, fx ved inkorporering i en tablet, pille eller bolus, som tvangsgives til dyret. Administrationen af den aktive bestanddel skal foretages under hensyntagen til det pågældende dyr og den anvendte husdyrpraksis.

Antibiotikum X-14934A har også virkning som middel, der forbedrer foderstofudnyttelsen hos drøvtyggere. Forbindelsen er virksom, dvs.

ændrer forholdet mellem flygtige fedtsyrer, hvilket afspejler sig i forøgede propionat-niveauer, i mængder på ca. 50 ppm.

Fremstillingen af X-14934A beskrives nærmere i nedenstående eksempler:

#### 5 EKSEMPEL 1

*Streptomyces* sp. X-14934 dyrkes og holdes på et stivelse-casein-agarskråstivnet substrat med nedenstående sammensætning (i g/l destilleret vand):

	Opløselig stivelse	10,0
10	Casein	1,0
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
	MgSO <sub>4</sub>	0,5
	Agar	20,0
15	pH indstilles på 7,4 med NaOH før autoklavering.	

Et skråstivnet substrat podet med kultur X-14934 inkuberes ved 28°C i 7-14 dage. Et stykke agar indeholdende sporer og mycelier fra den inkuberede skråkultur anvendes til at fremstille et vegetativt inokulum ved podning i en 500 ml's Erlenmeyer-kolbe indeholdende 100 ml medium med nedenstående sammensætning (g/l ledningsvand):

	Sojalose	10,0
	Cerelose	20,0
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
	CaCO <sub>3</sub>	0,2
25	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,001
	pH indstilles på 6,0 før sterilisation.	

Det podede medium inkuberes ved 28°C i 4 dage på et rotations-rysteapparat, der kører med 250 rpm. To 30 ml's portioner af den resulterende kultur anvendes til podning af to 6 liters Erlenmeyer-kolber, der hver indeholder 2 liter medium med den ovenstående sammen-

sætning. Disse podede 6 liters Erlenmeyer-kolber inkuberes i 4 dage ved 28°C på et roterende rysteapparat, der kører med 250 rpm. De fire liter resulterende vegetativ vækst anvendes til at pøde en 100 gallons (378,5 liter) fermentationsbeholder indeholdende 227,1 liter  
 5 produktionsmedium med nedenstående sammensætning (g/l ledningsvand):

	Cerelose	20,0
	Sojalose	10,0
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
	CaCO <sub>3</sub>	0,2
10	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,001
	pH-Værdien indstilles på 6,0 før sterilisation	
	SAG 4130® antiskummiddel (tilsættes efter behov under fermentation).	

15 Den podede beholder beluftes med komprimeret luft i en mængde på 85 liter/minut og omrøres med omrørere med 280 rpm. Fermentationen udføres ved 28°C i 97 timer.

#### Isolering af X-14934A-natriumsalt

20 Trin A: Til hele dyrkningsvæsken fra fermentation af 227,1 liter som angivet ovenfor sættes efter 139 timers vækst et lige så stort volumen ethylacetat. Efter omrøring i 1 time fraskiltes opløsningsmid-delfasen, og den vandige fase ekstraheredes igen med et lige så stort volumen ethylacetat som før. De to opløsningsmiddelfaser sammenhældtes og koncentreredes til 2,6 liter under reduceret tryk.

25 Trin B: Ethylacetatekstrakten koncentreredes yderligere til en olie. Olien opløstes i n-hexan og ekstraheredes fem gange med et lige så stort volumen acetonitril efterfulgt af én ekstraktion med aceto-nitril/methanol i forholdet 9:1. Acetonitril- og acetonitril/methanol (9:1)-ekstrakterne sammenhældtes, og opløsningsmidlet fjernedes under  
 30 reduceret tryk. Den således vundne remanens opløstes i ethylacetat og vaskedes efter tur med 1N HCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (mættet ved stuetemperatur) og H<sub>2</sub>O. Opløsningsmiddelfasen tørredes over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og koncentreredes til en olie (38 g) under reduceret tryk.

Trin C: Den resulterende olie fra trin B opløstes i methylenchlorid og chromatograferedes på en kolonne pakket med en methylenchloridopslætning af 500 g silicagel (Davisil® grade 62). Kolonnen elueredes med 2 liter methylenchlorid, 4 liter ethylacetat/hexan (7:3), 2 liter ethylacetat/methanol (95:5) og 2 liter ethylacetat/methanol (9:1).

Fraktioner på hver 20 ml opsamledes, og fraktion nr. 490-512 sammenhældtes. Opløsningsmidlet fjernedes under reduceret tryk, og remanensen (8 g) rechromatograferedes på en kolonne pakket med en methylenchloridopslætning af 250 g silicagel. Denne kolonne elueredes med 2 liter diethylether, 2 liter diethylether/ethanol (20:0,5), og der opsamledes fraktioner på hver 20 ml.

Trin D: Fraktion nr. 60-100 fra den ovenfor under trin C beskrevne 250 g silicagel-kolonne sammenhældtes, og opløsningsmidlet fjernedes under reduceret tryk. Krystallisation af acetonitril/vand gav krystallinsk antibiotikum X-14934A-natriumsalt-dihydrat. Smeltepunkt 156-158°C.

#### Mikroanalyse:

Beregnet for  $C_{48}H_{79}O_{15}Na \cdot 2H_2O$  (955,18):

	C	60,36	H	8,76	Na	2,41	H <sub>2</sub> O	3,77	
20	Fundet:	C	60,62	H	8,96	Na	2,34	H <sub>2</sub> O	4,52
		C	60,90	H	9,11				

#### EKSEMPEL 2

##### Fremstilling af X-14934A-rubidiumsalt

En opløsning af 100 mg antibiotikum X-14934A-natriumsalt i methylenchlorid vaskedes først med 1N HCl efterfulgt af vand og derefter fire gange med en vandig opløsning af RbOH. Opløsningsmiddelfasen tørredes ved filtrering gennem "Celite"® og koncentreredes under reduceret tryk, og der krystalliseredes af acetonitril ved tilsætning af vand. Omkrystallisation gav krystaller, der kunne anvendes til røntgenanalyse.

Analyse:

Beregnet for  $(C_{48}H_{79}O_{15})_2Rb(H_2O)_2$ :

C 60,25 H 8,53 Rb 4,47 H<sub>2</sub>O 1,88

Fundet: C 59,73 H 8,41 Rb 4,63 H<sub>2</sub>O 1,74

- 5 Den antimikrobielle virkning af antibiotikum X-14934A fremgår af nedenstående tabel:

	Organisme		Minimal inhiberende koncentration (MIC)** ( $\mu$ g/ml)
10			
		ATCC nr.	
	G- stave	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8705 >1000
		<i>Proteus vulgaris</i>	6380 >1000
15		<i>Escherichia coli</i>	27856 >1000
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	27858 >1000
		<i>Serratia marcescens</i>	27857 >1000
		<i>Serratia sp.</i>	93 >1000
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	10153 >1000
20	G+ cocci	<i>Streptococcus faecium</i>	8043 0,9
		<i>Staphylococcus aureus</i>	6538P 1,9
		<i>Micrococcus luteus</i>	9341 7,9
	G+ stave	<i>Bacillus megaterium</i>	8011 3,9
25		<i>Bacillus sp. E</i>	27359 0,45
		<i>Bacillus subtilis</i>	558* 3,9
		<i>Bacillus sp. TA</i>	27860 3,9
	G+ filamenter	<i>Mycobacterium phlei</i>	355 7,9
		<i>Streptomyces cellulosa</i>	3313 15,7
30	Skimmel- svampe	<i>Paecilomyces varioti</i>	25820 62,5
		<i>Penicillium digitatum</i>	26821 125
	Gærarter	<i>Candida albicans</i>	477* 7,9
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4226 125
35			

\* NRRL-nummer

\*\* den laveste koncentration, der stadig viser inhiberingszone ved agardiffusions-hulmetoden.

Som anført ovenfor har antibiotikum X-14934A og salte deraf med baser den egenskab, at de påvirker væksten af visse gram-positive bakterier i negativ retning. Det kan anvendes til vaskeopløsninger og til sanitære formål samt til håndvask og til rensning af udstyr, gulve eller møbler i forurenede rum eller laboratorier. Antibiotikummet kan også anvendes til at undertrykke væksten af følsomme organismer i pladeassays og andre mikrobiologiske medier.

Antibiotikum X-14934A har virkning mod *Treponema hyodysenteriae*, som fremkalder svinedysenteri. Tydelig virkning er vist for antibiotikummet i koncentrationer så lave som 1  $\mu\text{g/ml}$ .

Antibiotikum X-14934A har virkning som cocciostatisk middel.

Denne anticoccidiale virkning er demonstreret på forsøgskyllinger på følgende måde:

#### Testmetode

Ved testen anvendes 10 kyllinger for hver type medikament. 10 kyllinger anvendes som vægtkontrol og 10 kyllinger som inficeret kontrol. Medikamentet indgives 48 timer før infektionen. 1 g af testmedikamentet blandes i en mekanisk blander med en tilstrækkelig mængde kyllingefoder til at give den ønskede dosering. Infektionen består i ca. 200.000 oocyster indgivet oralt med pipette. Testen varer i 11 dage, og overlevende dyr dissikeres og undersøges for synlige læsioner i ceca. Testdyrene vurderes efter antallet af overlevende og antallet af cecallæsioner. Resultaterne udtrykkes som gennemsnitlig infektionsgrad (A.D.I.). En gennemsnitlig infektionsgrad på under 2,5 anses for signifikant.

## Virkning mod E. Tenella

Antibiotikum	Koncentration i foder, ppm	Vægt-øgelse, %	Dødelighed, %	Gennemsnitlig infektionsgrad
5				
Uinficerede, ubehandlede kontroldyr	0	100	0	0,0
10				
Inficerede, ubehandlede kontroldyr	0	60	20	3,0
Lasalocid	75	98	0	0,0
X-14934A	100	21	0	0,0
	25	25	0	0,0
15	10	101	0	0,6

## Virkning mod blandet infektion\*

				Øvre	Mid-del	Ce-ca
20	Uinficerede, ubehandlede kontroldyr	0	100	0	0,0	0,0
	Inficerede ubehandlede kontroldyr	0	34	20	3,0	3,0
25	X-14934A-natrium-salt	5	44	40	3,1	3,1
		10	65	20	2,7	2,4
		15	62	0	2,0	2,0

\* 500.000 oocyster af blandede Eimeria-arter, herunder en monensin-resistent E. tennella-stamme.

## EKSEMPEL 3

Et egnet, medikamenttilsat fjerkræfoder til anvendelse som starterfoder til kyllinger fremstilles ved at blande 10-15 ppm (beregnet på vægt) antibiotikum X-14934A i fjerkræets basale foderration bestående af:

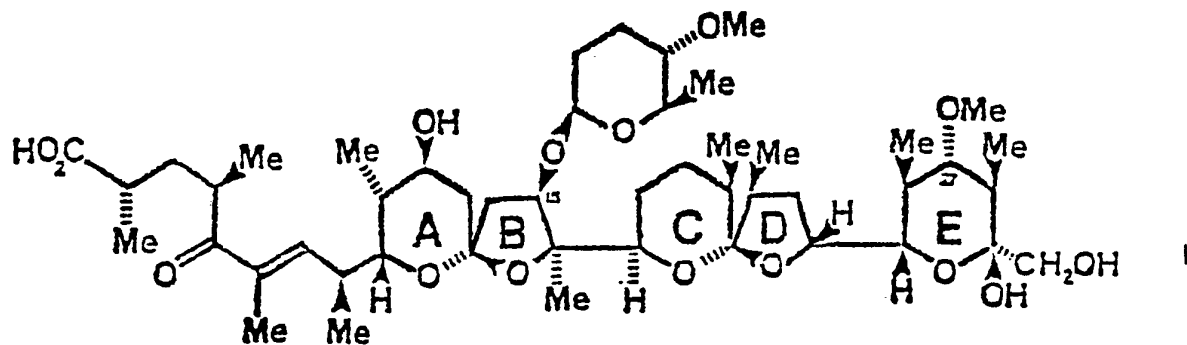
## Bestanddele:

	Majsmel, nr. 2, gult, formalet	kg/ton	0,5014
	Stabiliseret fedt eller vegetabilsk olie	kg/ton	26,787
5	Sojabønneoliemel (lavt fiberindhold, 50% protein)	kg/ton	214,299
	Majsglutenmel	kg/ton	22,323
	Fiskemel, behandlet med antioxidant, 60% protein	kg/ton	13,394
10	Fiskehydrolysat, tørret basis	kg/ton	4,4646
	Kød- og benafpuds, 50% protein	kg/ton	62,504
	Tørret majsstøbevand	kg/ton	22,323
	Alfalfamel, 17% protein, 220.459 enheder vitamin A/kg	kg/ton	13,394
15	Ioderet salt	kg/ton	2,2323
	Mangansulfat, foderkvalitet	kg/ton	0,3348
	Zinkcarbonat eller -oxid	kg/ton	0,1116
	Riboflavin	g	3
	Vitamin B <sub>12</sub>	mg	6
20	Calciumpantothenat	g	5
	Niacin	g	30
	Stabiliseret vitamin A-USPI-enheder		6.000.000
	Vitamin D <sub>3</sub> I.C.		650.000
	Vitamin E-acetat I.U.		5.000
25	Vitamin E (menadion-natriumbisulfit)	g	2
	DL-methionin eller analog	kg/ton	0,4465
	Antioxidant (ethoxyquin eller butyleret hydroxytoluen)	kg/ton	0,1116

- Lignende foderstoffer kan fremstilles indeholdende antibiotikummet i andre koncentrationer angivet i nærværende beskrivelse samt i form af den tørrede, ufiltrerede fermentationsvæske i en sådan mængde, at der fås den samme koncentration af aktivt antibiotikum.

## PATENTKRAV

1. Ionophort polyetherantibiotikum med formelen I



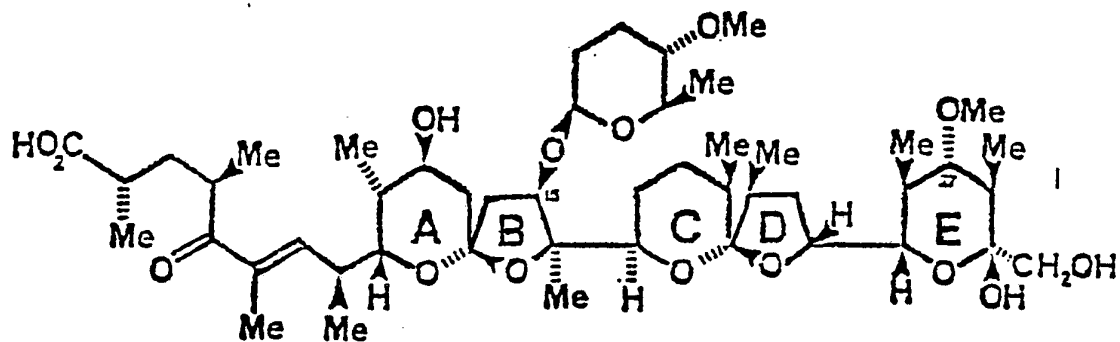
5 eller salte deraf med baser.

2. Forbindelse ifølge krav 1,

k e n d e t e g n e t ved, at saltet er et natriumsalt.

3. Forbindelse ifølge krav 1 til anvendelse som coccidiostatikum eller middel til forøgelse af foderudnyttelsen.

10 4. Fremgangsmåde til fremstilling af et ionophort polyetherantibiotikum med formelen I



eller et salt deraf med en base,

k e n d e t e g n e t ved, at stammen *Streptomyces* X-14934 NRRL 15518 dyrkes i en vandig carbonhydratopløsning indeholdende et nitro- genholdigt næringsmiddel under submerse aerobe betingelser, hvorefter forbindelsen med formlen I isoleres fra denne opløsning, og der, om  
5 ønsket, dannes et salt med en base af forbindelsen med formlen I.

5. Coccidiostatisk eller foderudnyttelsesforøgende præparat,  
k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder en virksom mængde af en forbindelse med den i krav 1 angivne formel I eller et salt deraf med en base.

10 6. Anvendelse af en forbindelse med den i krav 1 angivne formel I eller et salt deraf med en base som foderudnyttelsesforøgende middel.