



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104684409 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 03

(21) 申请号 201380051721. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 09. 24

A23K 1/18(2006. 01)

(30) 优先权数据

A23K 1/16(2006. 01)

61/708838 2012. 10. 02 US

C07D 401/04(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 04. 02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/061325 2013. 09. 24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/055286 EN 2014. 04. 10

(71) 申请人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 D. 埃萨特 B. D. 伯克 D. A. 科亚茨

J. G. 谢尔曼

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 翟建伟 李炳爱

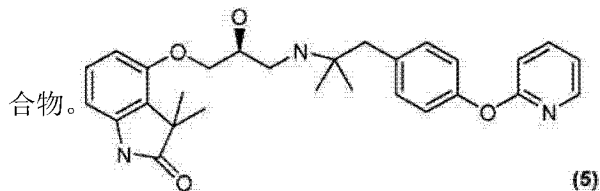
权利要求书2页 说明书12页

(54) 发明名称

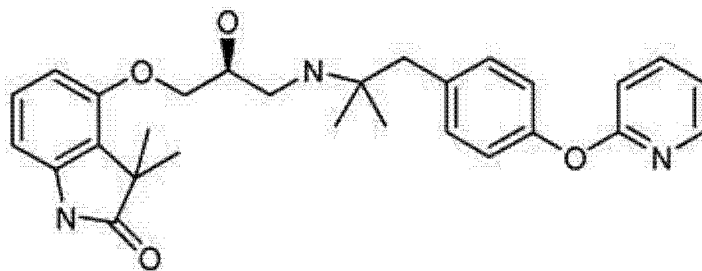
用于改善鸡生产的方法

(57) 摘要

本发明提供了改善鸡的生长表现、和 / 或增加从鸡可获得的肉和 / 或减少来自鸡或鸡饲养操作的气体排放的方法, 其包括向鸡施用有效量的化合物 5 或其生理学上可接受的盐。本发明中还包括了包含有效量的上述化合物和上述化合物的结晶半富马酸盐无水盐形式 II 的口服鸡饲料组

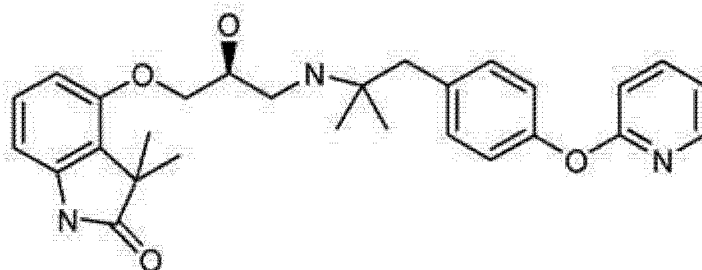


1. 改善鸡的生长表现的方法,其中所述方法包括向所述鸡口服施用有效量的下式化合物:



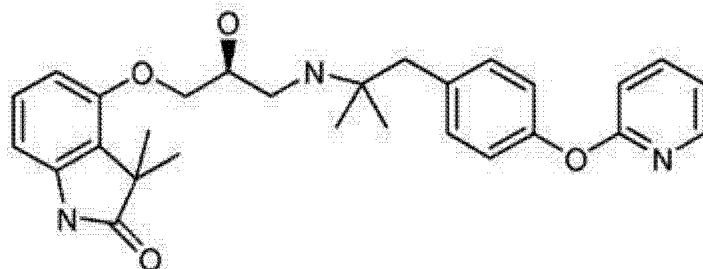
或其生理学上可接受的盐。

2. 增加鸡的肉的量的方法,其中所述方法包括向所述鸡口服施用有效量的下式化合物:



或其生理学上可接受的盐。

3. 减少来自鸡或鸡饲养操作的气体排放的方法,其中所述方法包括向所述鸡口服施用有效量的下式化合物:



或其生理学上可接受的盐。

4. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中所述化合物的生理学上可接受的盐是盐酸盐或半富马酸盐。

5. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中所述施用通过在动物饲料中包括所述化合物来实现。

6. 权利要求 5 的方法,其中所述化合物以约高于 0 至约 50 ppm 的量存在于所述饲料中。

7. 权利要求 5 或 6 中任一项的方法,其中所述化合物以至少约 7 ppm 的量存在于所述饲料中。

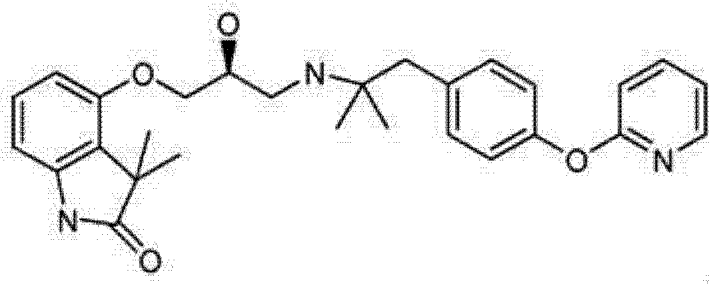
8. 权利要求 1-7 中任一项的方法,其中所述施用持续短时间段。

9. 权利要求 1-8 中任一项的方法,其中所述鸡是 *Gallus gallus domesticus*。

10. 权利要求 3 中任一项的方法,其中所述减少是 NH_3 的量。

11. 权利要求 1-10 中任一项的方法, 其中将额外活性成分施用于所述鸡。

12. 口服鸡饲料组合物, 其包含有效量的下式化合物:



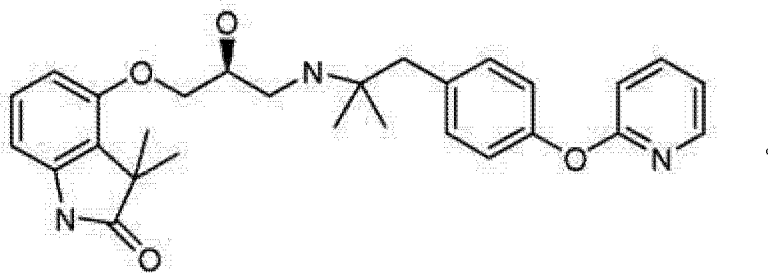
或其生理学上可接受的盐, 以及用于其的合适的载体, 和任选的一种或多种活性成分。

13. 权利要求 12 的组合物, 其中所述化合物的生理学上可接受的盐是盐酸盐或半富马酸盐。

14. 权利要求 12 或 13 的组合物, 其中所述化合物以高于 0 至约 50 ppm 的量存在于所述饲料中。

15. 权利要求 12-14 中任一项的组合物, 其中所述化合物以至少约 7 ppm 的量存在于所述饲料中。

16. 下式化合物的结晶半富马酸盐无水盐形式 II



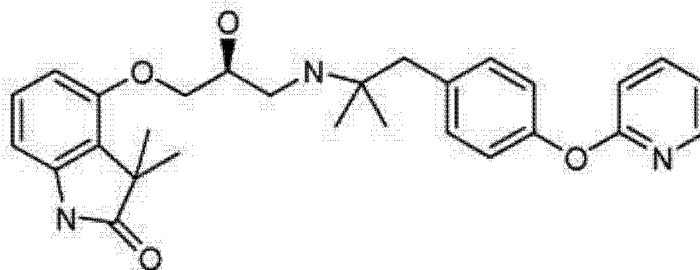
用于改善鸡生产的方法

[0001] 家畜动物的饲养不仅对于动物健康领域意义重大,而且对于人肉类消耗领域不可或缺。畜牧业中的一个重要目标是开发利用生物活性剂的方法,所述生物活性剂可以改善动物的生长表现,以及维持/改善从动物获得的肉的质量(例如肉与脂肪比率)和/或增加从动物获得的肉的量。理想地,此类生物活性剂有效维持/改善肉的质量,且增加肉的量。

[0002] 在鸡饲养操作中,动物产生气体,以及当动物废物分解时产生气体。具体地,所产生的氨气对鸡的健康和生长速率可以是有害的,并且氨排放到大气中是一个环境问题。为了解决这些问题,已经使用不同的方法来控制来自鸡饲养操作的氨排放。控制氨排放的一种方法是将化学物应用于动物废物。例如,在肉鸡的生产中,已知将化学物诸如硫酸氢钠、硫酸铝、硫酸铁或硫酸应用至鸡舍地板上的垫料中。当来自鸡废物的氨与化学物接触时,它反应并变成固体硫酸铵,结果它不作为气态氨排放到空气中。在典型的肉鸡操作中,在将鸡引入鸡舍之前,将化学物应用在鸡舍的地板上。鸡覆盖鸡舍的整个地板,并且随着它们成长,它们变得更大,更挤在一起。鸡在鸡舍中之后,目前不存在任何将化学物应用在地板上以控制氨的实用性方式。因此,在成长前两周之后,来自鸡废物的氨排放重新开始且在整个成长的剩余时间继续。

[0003] 因此,本发明提供了用于改善鸡的生长表现的方法和组合物。此外,本发明提供了用于增加从可鸡获得的肉的量的方法和组合物。本发明还提供了用于减少来自鸡和鸡饲养操作的气体排放的方法。本发明的所有实施方案中使用的化合物都表现出有利的诱变性和/或致畸性特征。

[0004] 本发明的方法和组合物采用以下化合物:



或其生理学上可接受的盐。

[0005] 本发明的化合物可以通过本领域已知的方法制备。例如, US6, 534, 504、W02002/38544、W0200238543、US 6, 825, 220、US7, 122, 680、US6, 841, 563、US6, 093, 735、US7, 041, 684 和 W02001/36412 中所述的方法说明了可用于制备本发明的化合物的方法。

[0006] 本公开的化合物可以反应以形成也可用于本发明的方法中的生理学上可接受的衍生物或盐。所述盐可以使用用于制备盐的标准程序来制备。术语“生理学上可接受的盐”是指与化合物的酸性或碱性部分结合存在的加成盐。此类盐包括以下中列出的生理学上可接受的盐: HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, P. H. Stahl 和 C. G. Wermuth (Eds.), Wiley-VCH, New York, 2002, 这是技术人员已知的。

[0007] 例如, 所述化合物可以用适当的酸中和以形成酸加成盐。酸加成盐包括通过与有机或无机酸反应形成的盐, 所述有机或无机酸诸如, 例如, 硫酸、盐酸、磷酸、乙酸、琥珀酸、

柠檬酸、乳酸、马来酸、富马酸、胆酸、双羟萘酸、粘酸、谷氨酸、樟脑酸、戊二酸、乙醇酸、苯二甲酸、酒石酸、甲酸、月桂酸、硬脂酸、水杨酸、甲磺酸、苯磺酸、山梨酸、苦味酸、苯甲酸、肉桂酸等酸。在本发明的一个实施方案中,所述化合物的生理学上可接受的盐是盐酸盐。在本发明的一个实施方案中,所述化合物的生理学上可接受的盐是半富马酸盐,特别是如下所述的结晶半富马酸盐无水盐形式 II。

[0008] 术语“鸡”是指物种 *Gallus gallus*, 包括 *Gallus gallus domesticus*。鸡可以是任何日龄。优选地,鸡小于 70 日龄,小于 65 日龄,或小于 60 天。优选地,鸡是肉鸡。

[0009] 如本文所使用,“改善生长表现”是指增强,包括根据具体情况减少或增加,鸡的生长的一个或多个方面。此类方面包括以下中的一种或多种:增加的平均每日增重 (ADG)、增加的增重效率、增加的饲料摄入、增加的热胴体重、增加的平均每日活体增重、增加的腿重量、增加的胸重量和减小的脂肪垫重量。“增加从鸡可获得的肉的量”包括增加鸡的总体肉,增加腿部肉,和 / 或增加胸部肉。“减少来自鸡或鸡饲养操作的气体排放”是指减少来自鸡或鸡饲养操作的 NH_3 或 H_2S 中的一者或两者。

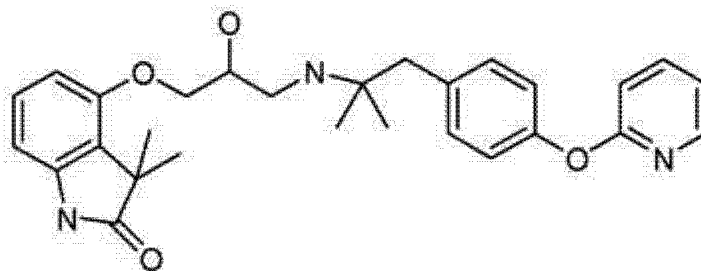
[0010] 如本文所使用,术语“有效量”是指,当施用于鸡时,改善鸡的生长表现,和 / 或增加从鸡可获得的肉的量和 / 或减少来自鸡或鸡饲养操作的气体排放的量。优选地,将本发明的化合物在鸡可以随意获得的动物饲料或水中提供给鸡。此外,本发明包括施用本发明的化合物与其他活性成分。因此,“有效量”包括本发明的化合物的这样的量,当与一种或多种其他活性成分施用时,其改善鸡的生长表现,和 / 或增加从鸡可获得的肉的量,和 / 或减少来自鸡或鸡饲养操作的气体排放。

[0011] 如本文所使用,术语“施用”是指向鸡口服施用有效量的本发明的化合物。对于口服施用,本发明的化合物可以与畜牧业中常用的合适的载体或稀释剂混合。包含本发明的化合物的动物饲料和饲料作为本发明的进一步实施方案提供。此类饲料中常用的典型的载体和稀释剂包括玉米粉、玉米芯粗粉、大豆粉、苜蓿粉、稻壳、大豆选矿、棉籽油粉、骨粉、磨碎的玉米、玉米芯粉、小麦麸、石灰石、磷酸二钙、氯化钠、尿素、蒸馏干燥谷物、维生素和 / 或矿物质混合物、甘蔗糖蜜、水或其他液体载体等。此类载体可以促进活性成分的均匀分布。本发明的化合物可以施用于任何日龄的鸡。优选地,将本发明的化合物施用于高达 70、65 或 60 日龄的鸡。在口服动物饲料组合物中,本发明的化合物的量可以是高于 0 至 2 ppm、2 至 50 ppm、3 至 40 ppm、3.5 至 10 ppm、5 至 10 ppm 或约 7 ppm。

[0012] 在本发明的一些实施方案中,将化合物施用于鸡持续各种时间段。在一个实施方案中,所述施用持续短时间段。如本文所使用,“短时间段”是指每日施用所述化合物,持续小于约 30 天,例如 14 天、21 天或 28 天。在另一个实施方案中,所述施用持续中时间段。如本文所使用,“中时间段”是指每日施用所述化合物,持续约 31 天至约 60 天,例如 42 天、48 天或 54 天。在又一个实施方案中,所述施用持续长时间段。如本文所使用,“长时间段”是指每日施用所述化合物,持续大于约 60 天,例如 75 天、90 天、100 天、111 天、120 天或更长时间。

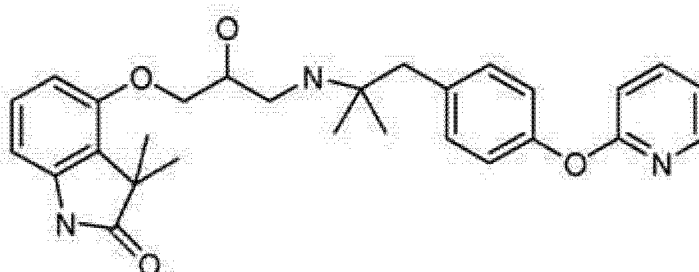
[0013] 以下项说明本发明。

[0014] 1. 改善鸡的生长表现的方法,其中所述方法包括向所述鸡口服施用有效量的下式化合物:



或其生理学上可接受的盐。

- [0015] 2. 第1项的方法,其中所述施用通过在动物饲料中包括所述化合物来实现。
- [0016] 3. 第1项或第2项的方法,其中将所述动物饲料任意提供给所述鸡。
- [0017] 4. 第1至3项中任一项的方法,其中所述化合物的生理学上可接受的盐是盐酸盐或半富马酸盐。
- [0018] 5. 第2至4项中任一项的方法,其中所述化合物以约2至约50 ppm的量存在于所述饲料中。
- [0019] 6. 第2至5项中任一项的方法,其中所述化合物以约3.5至约10 ppm的量存在于所述饲料中。
- [0020] 7. 第2至6项中任一项的方法,其中所述化合物以至少约7 ppm的量存在于所述饲料中。
- [0021] 8. 第1至7项中任一项的方法,其中所述施用持续短时间段。
- [0022] 9. 第1至7项中任一项的方法,其中所述施用持续中时间段。
- [0023] 10. 第1至7项中任一项的方法,其中所述施用持续长时间段。
- [0024] 11. 第1至10项中任一项的方法,其中所述鸡是 *Gallus gallus domesticus*。
- [0025] 12. 第1至11项中任一项的方法,其中所述鸡小于70日龄。
- [0026] 13. 第1至12项中任一项的方法,其中所述鸡是雄性。
- [0027] 14. 第1至13项中任一项的方法,其中所述鸡是肉鸡。
- [0028] 15. 第1至14项中任一项的方法,其中所述改善的生长表现是平均每日增重(ADG)、增重效率、饲料摄入、热胴体重、平均每日活体增重、腿重量、胸重量和脂肪垫重量中的至少一种。
- [0029] 16. 增加鸡的肉的量的方法,其中所述方法包括向所述鸡口服施用有效量的下式化合物:



或其生理学上可接受的盐。

- [0030] 17. 第16项的方法,其中所述施用通过在动物饲料中包括所述化合物来实现。
- [0031] 18. 第16项或第17项的方法,其中将所述动物饲料任意提供给所述鸡。
- [0032] 19. 第16至18项中任一项的方法,其中所述化合物的生理学上可接受的盐是盐

酸盐或半富马酸盐。

[0033] 20. 第 19 至 21 项中任一项的方法,其中所述化合物以约 2 至约 50 ppm 的量存在于所述饲料中。

[0034] 21. 第 17 至 20 项中任一项的方法,其中所述化合物以约 3.5 至约 10 ppm 的量存在于所述饲料中。

[0035] 22. 第 17 至 21 项中任一项的方法,其中所述化合物以至少约 7 ppm 的量存在于所述饲料中。

[0036] 23. 第 16 至 22 项中任一项的方法,其中所述施用持续短时间段。

[0037] 24. 第 16 至 22 项中任一项的方法,其中所述施用持续中时间段。

[0038] 25. 第 16 至 22 项中任一项的方法,其中所述施用持续长时间段。

[0039] 26. 第 16 至 25 项中任一项的方法,其中所述鸡是 *Gallus gallus domesticus*。

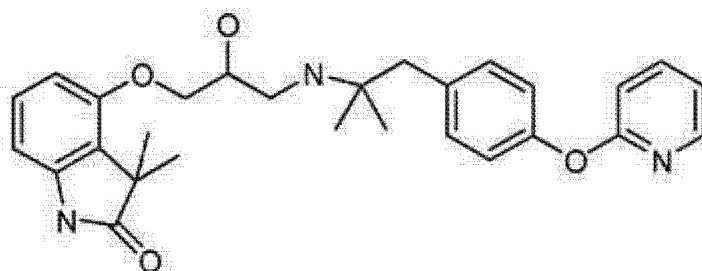
[0040] 27. 第 16 至 29 项中任一项的方法,其中所述鸡小于 70 日龄。

[0041] 28. 第 16 至 27 项中任一项的方法,其中所述鸡是雄性。

[0042] 29. 第 16 至 28 项中任一项的方法,其中所述鸡是肉鸡。

[0043] 30. 第 16 至 29 项中任一项的方法,其中所述增加是总体肉、腿部肉和 / 或胸部肉中的一种或多种的增加。

[0044] 31. 减少来自鸡或鸡饲养操作的气体排放的方法,其中所述方法包括向所述鸡口服施用有效量的下式化合物:



或其生理学上可接受的盐。

[0045] 32. 第 31 项的方法,其中所述施用通过在动物饲料中包括所述化合物来实现。

[0046] 33. 第 31 项或第 32 项的方法,其中将所述动物饲料任意提供给所述鸡。

[0047] 34. 第 31 至 33 项中任一项的方法,其中所述化合物的生理学上可接受的盐是盐酸盐或半富马酸盐。

[0048] 35. 第 31 至 34 项中任一项的方法,其中所述化合物以约 2 至约 50 ppm 的量存在于所述饲料中。

[0049] 36. 第 31 至 35 项中任一项的方法,其中所述化合物以约 3.5 至约 10 ppm 的量存在于所述饲料中。

[0050] 37. 第 31 至 36 项中任一项的方法,其中所述化合物以至少约 7 ppm 的量存在于所述饲料中。

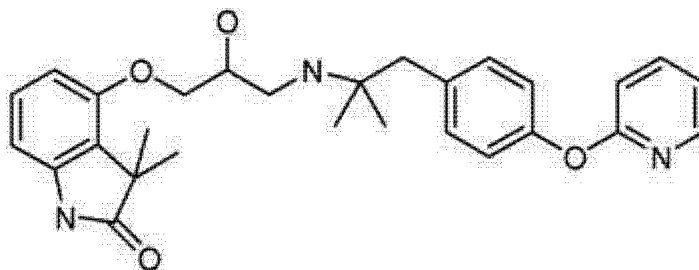
[0051] 38. 第 31 至 37 项中任一项的方法,其中所述施用持续短时间段。

[0052] 39. 第 31 至 37 项中任一项的方法,其中所述施用持续中时间段。

[0053] 40. 第 31 至 37 项中任一项的方法,其中所述施用持续长时间段。

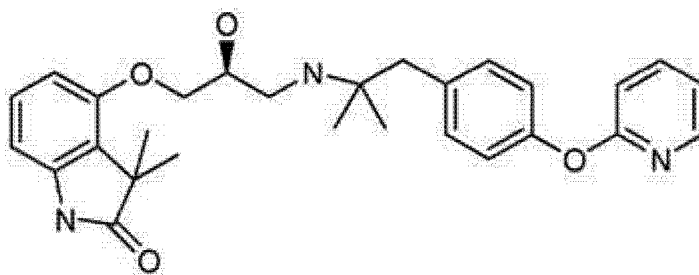
[0054] 41. 第 31 至 40 项中任一项的方法,其中所述鸡是 *Gallus gallus domesticus*。

- [0055] 42. 第 31 至 40 项中任一项的方法,其中所述鸡小于 70 日龄。
- [0056] 43. 第 31 至 41 项中任一项的方法,其中所述鸡是雄性。
- [0057] 44. 第 31 至 42 项中任一项的方法,其中所述鸡是肉鸡。
- [0058] 45. 第 31 至 43 项中任一项的方法,其中所述减少是 NH_3 的量。
- [0059] 46. 第 1 至 45 项中任一项的方法,其中将额外活性成分施用于所述鸡。
- [0060] 47. 口服鸡饲料组合物,其包含有效量的下式化合物:



或其生理学上可接受的盐,以及用于其的合适的载体,和任选的一种或多种活性成分。

- [0061] 48. 第 47 项的组合物,其中所述化合物的生理学上可接受的盐是盐酸盐或半富马酸盐。
- [0062] 49. 第 47 项或第 48 项的组合物,其中所述化合物以约 2 至约 50 ppm 的量存在于所述饲料中。
- [0063] 50. 第 47 至 49 项中任一项的组合物,其中所述化合物以约 3.5 至约 10 ppm 的量存在于所述饲料中。
- [0064] 51. 第 47 至 50 项中任一项的组合物,其中所述化合物以至少约 7 ppm 的量存在于所述饲料中。
- [0065] 52. 第 1-51 项中任一项的方法或组合物,其中所述化合物是



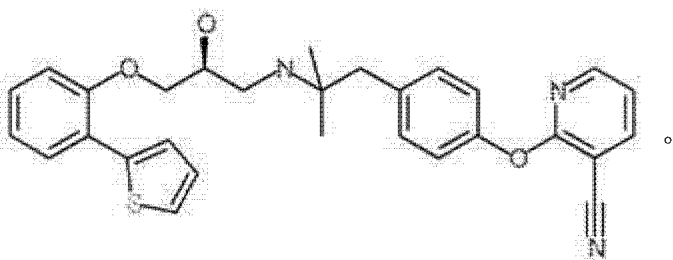
或其生理学上可接受的盐。

[0066] 研究 1

以下化合物用于研究中。

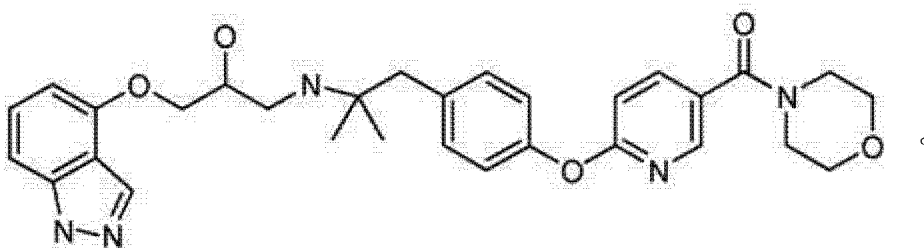
[0067] 化合物 1 :阳性对照

2-[4-(2-{[(2S)-2-羟基-3-(2-苯硫-2-基苯氧基)丙基]氨基}-2-甲基丙基)苯氧基]吡啶-3-甲腈



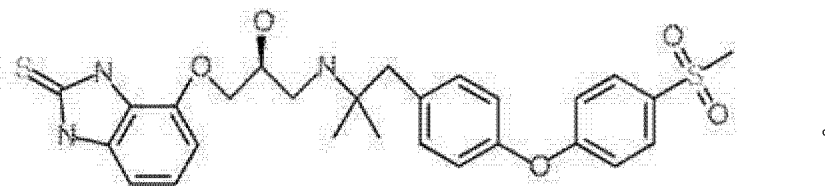
[0068] 化合物 2

(2S)-1-([1,1-二甲基-2-(4-[5-(吗啉-4-基羰基)吡啶-2-基]氧基)苯基)乙基]氨基)-3-(1H-吡唑-4-基氧基)丙-2-醇



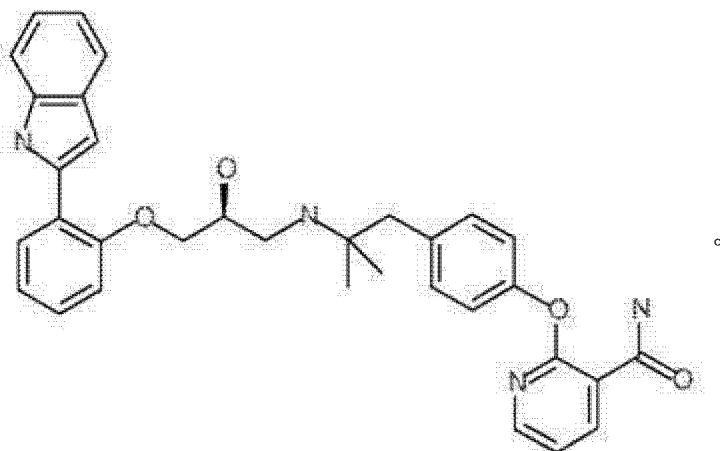
[0069] 化合物 3

4-((2S)-3-([1,1-二甲基-2-(4-[4-(甲基磺酰基)苯氧基]苯基)乙基)氨基]-2-羟基丙基)氧基)-1,3-二氢-2H-苯并咪唑-2-硫酮



[0070] 化合物 4

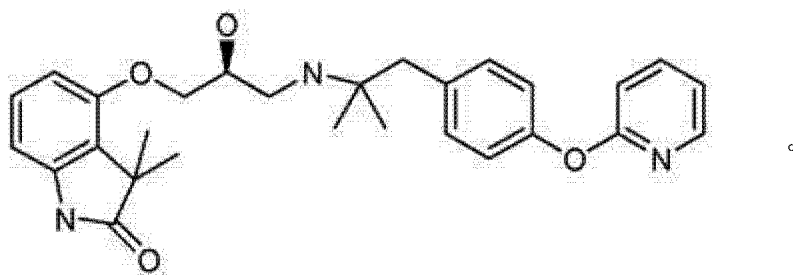
2-[4-[2-((2S)-2-羟基-3-[2-(1H-吡唑-2-基)苯氧基]丙基)氨基)-2-甲基丙基]苯氧基]吡啶-3-甲酰胺



[0071] 化合物 5

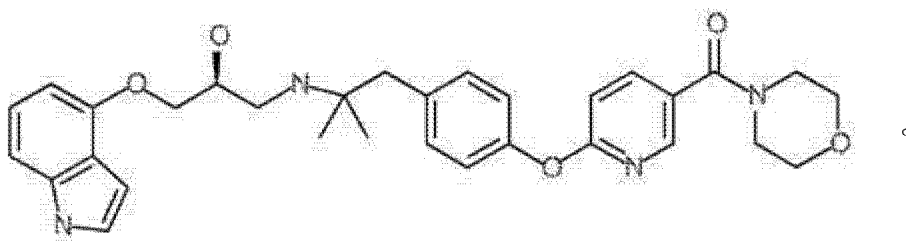
4-([(2S)-3-([1,1-二甲基-2-[4-(吡啶-2-基氧基)苯基]乙基)氨基)-2-羟基丙基]氨基)-2-羟基丙基

基]氧基 }-3,3-二甲基 -1,3-二氢 -2H-吡啶 -2-酮盐酸盐



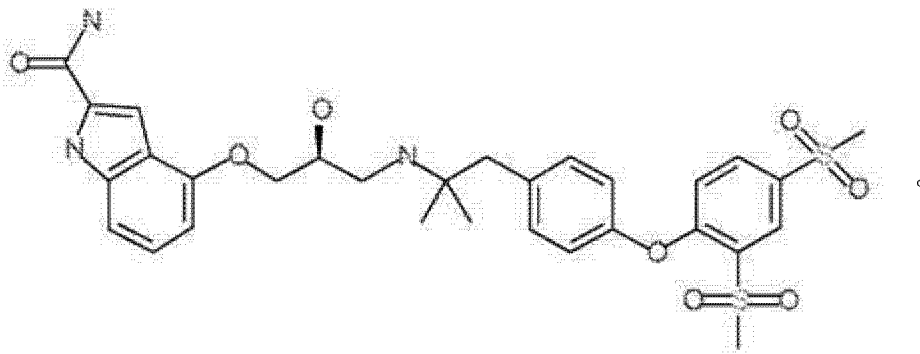
[0072] 化合物 6

(2S)-1-([1,1-二甲基 -2-(4-{[5-(吗啉 -4-基羰基)吡啶 -2-基]氧基 }苯基)乙基]氨基 }-3-(1H-吡啶 -4-基氧基)丙 -2-醇



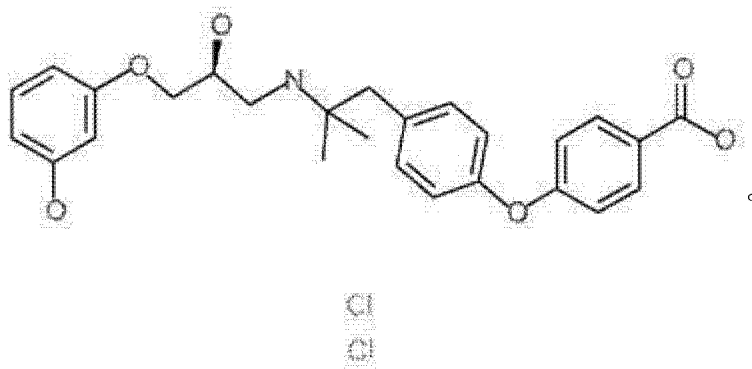
[0073] 化合物 7

4-([2S)-3-[(2-{4-[2,4-双 (甲基磺酰基)苯氧基]苯基 }-1,1-二甲基乙基)氨基]-2-羟基丙基]氧基)-1H-吡啶 -2-甲酰胺



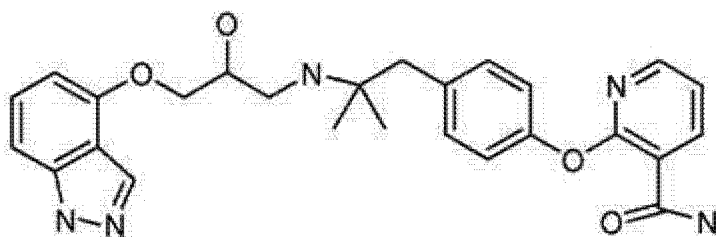
[0074] 化合物 8

4-[4-(2-{[2-羟基 -3-(3-羟基苯氧基)丙基]氨基 }-2-甲基丙基)苯氧基]苯甲酸二盐酸盐



[0075] 化合物 9

2-[4-(2-[(2S)-2-羟基-3-(1H-吡唑-4-基氧基)丙基]氨基)-2-甲基丙基)苯氧基]吡啶-3-甲酰胺



[0076] 本研究的目的是通过将非零剂量的上述化合物相比于阳性对照（化合物 1）和阴性对照进行比较来评价雄性肉鸡的生长表现和胴体响应。表 1 记载了具体处理组：

表 1

处理描述	处理剂量 (ppm)	处理阶段 持续时间 (天)	围栏 数目	每个围栏的 动物数	动物的 总数目
对照	0	14	10	14	140
阳性对照 化合物1	15	14	10	14	140
化合物2	15	14	10	14	140
化合物3	15	14	10	14	140
化合物4	15	14	10	14	140
化合物5	15	14	10	14	140
化合物6	15	14	10	14	140
化合物7	15	14	10	14	140
化合物8	15	14	10	14	140
化合物9	15	14	10	14	140
总计			100		1400

[0077] 施用途径为口服，其中化合物混合在饲料中，并且随意提供。本研究的第 1 天的鸡龄为 35 日龄。在以下天称量体重：

- 1) 研究第 1 天（围栏重量）
- 2) 研究第 14 天（个体动物重量）

- 3) 研究第 15 天 (所选动物上的个体重量)
- 4) 研究第 16 天 (区块 1-5)
- 5) 研究第 17 天 (区块 6-10)。

[0078] 收集最终重量之后,在个体动物上收集以下处理数据 (热重量):

- 1) 活体重量
- 2) 热胴体重
- 3) 脂肪垫重量
- 4) 热胸肌重量
- 5) 热腿骨重量。

[0079] 阳性对照,化合物 1,仅导致改善的 ADG、饲料摄入、平均每日活体增重。所有化合物都导致热胴体重的数值改善。三种化合物,化合物 2、5 和 9,表现出比阴性对照和阳性对照两者显著更好的改善。增重对于所有三种化合物都与饲料摄入的显著增加相关,并且对于化合物 2、5 和 9 显著大于未处理的对照。化合物 2、5 和 9 还减少脂肪垫重量,但差异仅对于化合物 5 和 9 是显著的。表现好于未处理对照的化合物的相比于对照的百分比变化总结在下表 2 中。

[0080] 表 2

基于与对照的百分比变化,相比于阴性对照,比阳性对照 (化合物 1) 在改善表现方面显著更好的化合物

化合物#	ADG% 增加	增重效率 % 增加	饲料 摄入 % 增加	热胴 体重 % 增加	平均每 日活体 增重 % 增加	腿 重量 % 增加	胸 重量 % 增加	脂肪垫 重量 % 减少
化合物1	4.4	1.6*	2.7	2.4*	4.0	1.2*	3.5*	9.8*
化合物2	8.7	3.8	4.8	6.1	8.3	8.2	6.1	12.8*
化合物3	1.6*			2.7				
化合物4	-1.6*			0.3*				
化合物5	5.1	4.9	1.1*	5.8	5.8	8.1	6.0	17.4
化合物6	3.9			3.8				
化合物7	2.0*			1.2*				
化合物8	-0.4*			0.8*				
化合物9	8.9	6.7	2.1*	5.0	9.3	7.9	4.8	17.8

* 相比于阴性对照没有显著增加或减少。

[0081] 研究 2

化合物 2、5 和 9 用于本研究中。通过将非零剂量的化合物相比于阴性对照 (在屠宰前的最后 14 天内施用) 进行比较来进行研究以评价雄性肉鸡的生长表现和胴体响应。表 3 记载了具体处理组。

表3

处理描述	处理剂量 (ppm)	处理阶段 持续时间 (天)	围栏 数目	每个围栏的 动物数	动物的 总数目
组1: 对照	0	14	16	14	224
组2: 化合物9	3.5	14	16	14	224
组3: 化合物9	7	14	16	14	224
组4: 化合物2	3.5	14	16	14	224
组5: 化合物2	7	14	16	14	224
组6: 化合物5	3.5	14	16	14	224
组7: 化合物5	7	14	16	14	224
总计			112		1568

[0082] 施用途径为口服,其中化合物混合在饲料中,并且随意提供。本研究的第1天的鸡龄为35日龄。在以下天称量体重:

- 1) 研究第1天(围栏重量)
- 2) 研究第15天(个体动物重量)
- 3) 研究第16天(区块1-4中动物中所选动物上的个体重量)
- 4) 研究第17天(区块5-8中动物中所选动物上的个体重量)。

[0083] 收集最终重量之后,在个体动物上收集以下处理数据(热重量):

- 1) 活体重量
- 2) 热胴体重
- 3) 脂肪垫重量
- 4) 热胸肌重量
- 5) 热腿骨重量。

[0084] 当比较阴性对照组(GP1)和所有处理组的ADG、G/F和F/G(分别为增重:饲料效率和饲料:增重效率)、热胴体重、热胸重量和热腿骨重量时,处理效果是显著的。此外,组GP3、GP6、和GP7中的动物比阴性对照组中的动物具有显著更高的ADG。组GP3中的动物比阴性对照组中的动物具有显著更高的ADFI。组GP4中的动物比阴性对照组中的动物具有显著更低的ADFI。组GP2、GP3、GP5、GP6、和GP7中的动物比阴性对照组中的动物具有显著更高的G/F比率、热胴体重、热胸肌重量和热腿骨重量。组GP2、GP3、GP5、GP6、和GP7中的动物比阴性对照组中的动物具有显著更低的F/G比率。

[0085] 研究3

进行本研究,以确定当饲喂“典型”饲料时饲养至小尺寸市场的商业肉鸡的活体表现和胴体产量中测量的化合物5的剂量响应。2400 Hubbard M99 X Cobb小鸡(1200只雄性/1200只雌性)用于本研究。化合物5以以下剂量施用:0、2、4、8、和16 ppm,口服饲料,当小鸡为24日龄时开始,当小鸡为38日龄时结束。五种不同的化合物5剂量在糊状膳食(mash diet)中施用,所述糊状膳食仅使用市售成分配制以满足所有营养建议。

[0086] 本研究中测量的参数包括ADG(平均每日增重)、ADFI(平均每日饲料摄入)、GE(增重效率)和FE(饲料效率)。测量禽类的胴体(不含内脏)、胸肌(无骨-无皮)和腿部四分之一重量。处理当天的活体重用于计算禽类的胴体、胸肉和腿部四分之一的产量。

[0087] 对于 GE、FE 和腿部四分之一重量和产量观察到改善, 尽管高于 2 ppm 的剂量没有显示额外的益处。GE 和 FE 仅在雌性肉鸡中受到积极影响。化合物 5 响应由于脂肪沉积状态而与日龄相关, 且 24-38 日龄肉鸡未显示对其他测量参数的影响, 这是由于动物日龄幼小, 因此缺乏脂质组织沉积。此外, 本研究中雌性、但非雄性改善 FE 和 GE 两者的能力进一步表明, 考虑到雌性肉鸡比雄性肉鸡更快且以更高比例累积脂质组织, 这些响应可与脂肪体组成相关。

[0088] 研究 4

进行本研究以研究化合物 5 对肉鸡的活体表现和胴体性状的影响, 并且评价从提供有或无化合物 5 的饲料的肉鸡的各种气体的排放。Ross X Ross 708 雄性小鸡用于本研究。化合物 5 以下剂量施用: 0 和 16 ppm, 口服饲料, 当小鸡为 34 日龄时开始, 当小鸡为 48 日龄时结束。化合物 5 剂量在糊状膳食中施用, 所述糊状膳食仅使用市售成分配制以满足所有营养建议。

[0089] 本研究中测量的参数包括 ADG、ADFI 和 FCR。测量禽类的胴体 (不含内脏)、胸肌 (无骨-无皮)、腿部-四分之一和腹部脂肪重量。处理当天的活体重用于计算禽类的胴体、胸肉和腿部四分之一的产量。还测量各种气体的排放。监测并计算以下气体的累积气体排放: NH_3 、 NO 、 NO_2 、 H_2S 、 SO_2 、甲烷 / 非甲烷总碳氢化合物、 O_2 和 CO_2 。化合物 5 的效率通过这些气体的累积排放, 以及通过将这些累积值针对它们的身体、胴体、胸肉和腿部-四分之一重量标准化来测定。

[0090] 补充化合物 5 导致监测的所有活体表现胴体性状 (除了 ADFI 和死亡率) 的改善。当与未处理的禽类比较时, 由给予化合物 5 的禽类的 NH_3 和 H_2S 的累积排放分别降低 29.2% 和 19.0%。当考虑到禽类的活体重量或其可销售的切割物的增加时, 所得标准化的差异增加至 NH_3 排放减少超过 30%。

[0091] 毒性筛选

化合物 5 表现出有利的诱变性和 / 或致畸性特征。例如, 化合物 5 显示比所测试的其他化合物更好的 Ames 测定 (诱变性) 和斑马鱼测定 (致畸 / 染色体影响) 的结果。

[0092] 化合物 5 的结晶半富马酸盐无水盐形式 II 的制备

化合物 5 的 HCl 盐的可接受的晶体形式的可重复性问题已经导致寻找更合适的盐形式。化合物 5 的结晶半富马酸盐无水盐形式 II 表现出有利的结晶、产率和可重复性。化合物 5 的结晶半富马酸盐无水盐形式是化合物 5 半富马酸盐的两种形式之一- 另一种是具有不利的特征的溶剂化形式。化合物 5 的其他盐形式也具有不利的特征, 使得化合物的半富马酸盐无水盐形式 2 是唯一确定满足必需标准的结晶盐形式。

[0093] 结晶半富马酸盐无水盐形式 II 通过将 2 g 化合物 5 的游离碱放置在小瓶中进行制备。将固体溶解在 10 mL EtOH 中, 同时在 60°C 以 1000 rpm 搅拌, 以得到澄清的黄色溶液。然后将该溶液慢慢与 251 mg 富马酸 (溶解在 5 mL EtOH 中) 在 1 mL 等分试样中混合。将样品搅拌 15 分钟, 得到非常稠的白色浆料。再添加 15 mL EtOH 以使得总溶剂体积至 30 mL。将样品在 60°C 再浆化 30 分钟。得到白色固体的稠浆。将白色固体通过真空过滤分离, 并在适当的地方在真空和空气流下干燥 10 分钟。将源小瓶和滤饼用 10 mL 乙醇的等分试样洗涤 2 次, 以使回收率最大化。得到白色固体的厚饼, 并且将该固体放置在 65°C 真空烘箱中过夜。回收 1.878 g (75.48% 产率)。

[0094] 差示扫描热量分析在 TA 仪器 DSC 单元 Q2000 上实施。在 50 mL/min 的氮气吹扫的情况下,将样品在卷曲铝盘中以 10°C /min 从 25°C 加热至 300°C。DSC 温度用钢标准品校准,开始为 156.3–156.9°C。化合物 5 的结晶半富马酸盐无水盐形式 II 表现出通过 DSC 的在 203.73°C 的熔点开始。

[0095] 结晶固体的 X 射线衍射 (XRD) 图在配备有 CuK α 源 ($\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$) 和 Vantec 检测器在 35 kV 和 50 mA 下操作的 Bruker D4 Endeavor X-射线粉末衍射仪上获得。在 4 和 40° (以 2θ 计) 之间,用 0.009° 的步长 (以 2θ 计) 和 0.5 秒 / 步的扫描速率,和 0.6mm 散度,5.28 固定的反散射和 9.5mm 检测器狭缝扫描该样品。将干燥粉末填装在石英样品架上,并使用载玻片获得光滑的表面。晶体形式衍射图在环境温度和相对湿度收集。在结晶学领域中众所周知的是,对于任何给定晶形,衍射峰的相对强度可能由于因素诸如结晶形态学和习性引起的优选取向而不同。当存在优选取向的效应时,峰强度改变,但多晶形物的特征峰位置不变。此外,在结晶学领域中也众所周知的是,对于任何给定晶形,角峰位置可能稍微改变。例如,由于分析样品时的温度或湿度的变化、样品移位或内部标准品的存在或不存在,峰位置可以移动。在本情况下,0.2 (以 2θ 计) 的峰位置变化将考虑这些潜在变化而不妨碍明确鉴定指定的晶形。可以基于特征峰 (以 ° 2θ 为单位) (通常为更显著的峰) 的任何独特的组合确认晶形。(美国药典 (United States Pharmacopeia) #35, 国家处方 (National Formulary) #30, 第 <941> 章, 第 427–432 页, 2012)。在室温和相对湿度下收集的晶形衍射图基于 NBS 标准参考材料 675 (云母 (mica)) 进行调整,峰在 8.853 和 26.774 度 ($2-\theta$)。

[0096] 结晶半富马酸盐无水盐形式 II 的制备样品通过使用 CuK α 照射的 X 射线衍射图表征为具有如下表 4 中所述的衍射峰 ($2-\theta$ 值)、具体而言具有在 19.32 的峰以及一个或多个选自 12.32、14.69 和 21.09 的峰;其中衍射角的公差为 0.2 度。

表 4

化合物5结晶半富马酸盐无水盐形式II 峰位置		
峰	角度($2-\theta$) $\pm$ 0.2°	相对强度(最强峰的%)
1	5.22	34.70
2	6.74	38.30
3	9.85	37.50
4	12.32	94.30
5	13.27	34.40
6	14.69	95.30
7	16.46	35.90
8	19.32	100.00
9	21.09	72.00
10	26.54	51.30