NORGE
(19) [NO]

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) UTLEGNINGSSKRIFT (11) Nr. 160859

(51) Int. Cl.⁴ C 12 P 17/16, C 07 D 407/14

(21) Patentsøknad nr. 844663
(22) Inngivelsesdag 22.11.84
(24) Løpedag 22.11.84
(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(86) Internasjonal søknad nr. -
(86) Internasjonal inngivelsesdag -
(85) Videreføringsdag -
(41) Alment tilgjengelig fra 24.05.85
(44) Utlegningsdag 27.02.89

(71)(73) Søker/Patenthaver F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AKTIENGESELLSCHAFT, Grenzacherstrasse 124-184, CH-4002 Basel, Sveits.

(72) Oppfinner CHAO-MIN LIU, Cedar Grove, NJ, JOHN WESTLEY, Cedar Grove, NJ, USA.

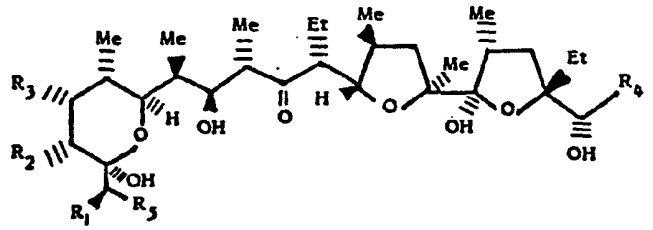
(74) Fullmektig A/S Oslo Patentkontor Dr.ing. K.O. Berg, Oslo.

(30) Prioritet begjært 23.11.83, US, nr 554506.

(54) Oppfinnelsens benevnelse **FREMGANGSMÅTE FOR FREMSTILLING AV POLYETERANTIBIOTIKA VED FERMENTERING AV STREPTOMYCES X-14889 NRRL 15517.**

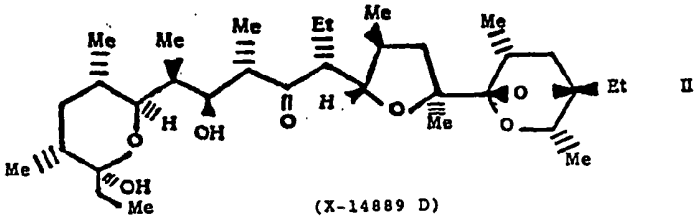
(57) Sammendrag

Antibiotiske forbindelser kalt Antibiotika X-14889A, C og D med formlene



I

hvor (for X-14889A) R_1 er metyl, R_2 er metyl, R_3 er hydrogen, R_4 er metyl og R_5 er hydrogen eller (for X-14889C) R_1 er hydrogen, R_2 er metyl, R_3 er hydrogen, R_4 er metyl og R_5 er CO_2H.



II

(X-14889 D)

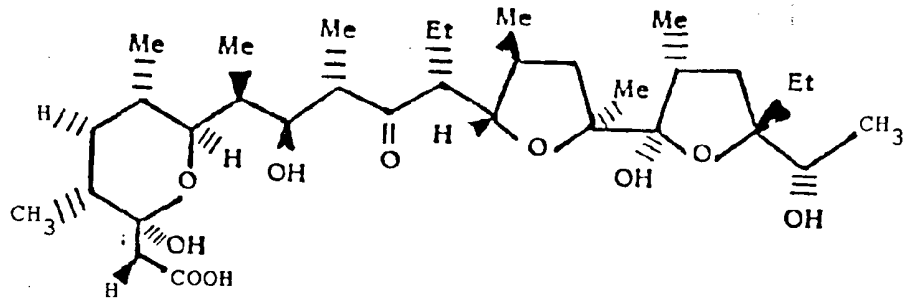
og de farmasøytisk akseptable salter derav.

Fremstilling av forbindelsene er beskrevet samt fremstilling av en annen kjent komponent Antibiotikum X-14889B.

Forbindelsene viser antimikrobiell aktivitet og en av forbindelsene X-14889C viser også aktivitet mot Treponema hyodysenteriae (in vitro), Plasmodium berghei og egner seg til å forsterke fôrutnyttelsesgraden hos drøvtyggere.

(56) Anførte publikasjoner Europeisk (EP) patentsøknad, publ. nr. 88446.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av antibiotika X-14889C med formelen:



I

samt farmasøytisk akseptable salter derav,

ved fermentering av den nye stammen Streptomyces sp. X-14889 NRRL 15517 i en vandig oppløsning inneholdende et nitrogenholdig næringsmiddel under neddykkede aerobiske betingelser og deretter isolere forbindelsen X-14889C fra oppløsningen, og, om ønsket, konvertere forbindelsen til farmasøytisk akseptable syreaddisjonssalter.

En kultur av den levende organisme som har fått laboratoriebetegnelsen X-14889 er deponert 11. juli 1983 i US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Northern Regional Research Laboratories, Peoria, Ill. og tilføyet deres mikroorganismesamling som NRRL 15517. Kulturen ligner mest Streptomyces sparsogenes.

Stammen Streptomyces X-14889 har følgende karakteristika:

Mikroskopiske og kjemiske karakteristika

Kultur X-14889 vokser i agarmedia med forskjellige sammensetninger som gir en veksttype som er karakteristisk for

mange aerobe aktinomyceter. Et substratmycel trenger inn i agaren og forblir uten fragmenter, mens en del av luftvekstmassen differensierer i kjeder av sporer. Kjedene er åpne til tette spiraler og inneholder mer enn 10 sporer pr. kjede. Sporene er taggede og deres gjennomsnittsdimensjoner er 0,65 x 0,91 um.

Kromatografisk analyse av helcellehydrolysater viser at LL-diaminopimelinsyre foreligger, som i tillegg til de ovenfor oppførte egenskaper, tyder på at stamme X-14889 tilhører slekten Streptomyces.

Makroskopiske karakteristika

Karakteristika for vekst i forskjellige agarmedier er sammenfattet i tabell 1 nedenunder. Dataene ble registrert etter 14 dagers inkubering ved 28°C.

Tabell 1

Medium	Mengde av sporuleringsgrad	Farve av aerialmasse (1)	Farve av det reverse mycelium (1)
Gjær-malt-ekstrakt (ISP-2)	rikelig vekst; voksaktig utseende, ingen sporulering	koffertbrun (4 pg)	koffertbrun (4 pg)
Hvete-agar (ISO-3)	rikelig vekst; god sporulering	asker (5 fe)	grå (g), blandet med brun (3 cg)
Uorganisk salt-agar (ISP-4)	rikelig vekst; ingen sporulering	eikebrun (4 pi)	lysbrun (4 ng)
Glycerol-aspara-gin agar (ISP-5)	dårlig vekst; ingen sporulering	lysgrå (c)	lysgrå (c)

(1) Farvekoden er den av the Color Harmony Manual, 4. utgave, Container Corporation of America, 1958.

Fysiologiske karakteristika

Kultur X-14989 kan vokse på glukose, galaktose, fruktose, arabinose, rhamnose, mannitol, sukrose og raffinose. Det er ingen vekst på xylose, inositol eller cellulose, og liten eller tvilsom vekst på salicin. Vekst inhiberes av streptomycin. Melaninproduksjon i ISp-7 medium, H_2S produksjon i ISP-6 medium og nitratreduksjon i ISp-8 medium er negative. Gelatin og kasein hydrolyseres, men ikke stivelse. NaCl toleransen er lav (mindre enn 2%).

Taksonomiske slutninger

De fenotypiske trekk som er oppført ovenfor for kultur-X-14889 gjør det mulig å henføre denne kultur til en gruppe Streptomyces arter som har en markert likhet med stammen som studeres under studiet ifølge fenotypiske data angitt i litteraturen, dvs.,

[Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edition. Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1968. Cooperative description of type cultures of Streptomyces. II. Species descriptions from first study. Int. J. Syst. Bacteriol. 18: 69-189.

Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1968. Cooperative description of type cultures of Streptomyces. III. Additional species descriptions from first and second studies. Int. J. Syst. Bacteriol. 18: 279-392.

Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1969. Cooperative description of type strains of Streptomyces. IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies. Int. J. Syst. Bacteriol. 19: 391-512.

Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1972. Cooperative description of type strains of Streptomyces. V. Additional descriptions. Int. J. Syst. Bacteriol. 22: 265-394].

A.S.M. A/S. 15.000. 6.84

Artene er S. albaduncus, S. canus, S. cuspidosporus, S. olivoviridis, S. craterifer, S. saraceticus og S. sparsogenes. S. albaduncus skiller seg fra X-14889 ved forbruk av xylose, inositol og sukrose; S. canus utnytter xylose og inositol; S. cuspidosporus vokser på xylose, inositol og salicin; S. olivoviridis er negativ på raffinose og sukrose er positiv på xylose; S. craterifer utnytter xylose og utnyttelsen av sukrose og raffinose er tvilsom; S. saraceticus utnytter xylose, men utnyttelsen av rhamnose er tvilsom. S. sparsogenes er kanskje den art som ligner mest på X-14889. Ingen av organismene sporulerer godt på utvalgte media, og utnyttelsen av sukkere ligner med unntak av xylose, som utnyttes av S. sparsogenes, og av galaktose, for hvilken denne art er negativ. Andre forskjeller er at de individuelle sporer i sporekjedene til S. sparsogenes er utydelige, hvilket tyder på et folie og at spormassen har hygroskopisk karakter. Sammenfattet, selv om X-14889 ligner flere andre typer Streptomyces, adskiller produksjonen av unike antibiotika og flere fysiologiske og morfologiske egenskaper den fra alle andre arter som den er blitt sammenlignet med.

Streptomyces sp. X-14889 produserer ved dyrking under egnede betingelser forbindelsen med formel I sammen med antibitoka X-14889 A, B og D. En fermenteirngsvæske som inneholder Streptomyces sp. X-14889 fremstilles ved å inokulere sporer eller mycel av organismen som produserer forbindelsen X-14889 A-D i et egnet medium, og så dyrke under aerobe betingelser. For fremstilling av forbindelsene X-14889 A-D,

er dyrkning på fast medium mulig, men for fremstilling av større mengder foretrekkes dyrking i et væskemedium. Dyrkningstemperaturen kan varieres over et stort område, 20-35°C, innenfor hvilket organismen kan vokse, men en temperatur på 26-30°C og en hovedsakelig nøytral pH foretrekkes. I en aerob dypkultur av organismen for fremstilling av forbindelsene X-14889 A-D, kan mediet som karbonkilde inneholde en handelsglyseridolje eller et karbohydrat såsom glycerol, glykose, maltose, laktose, dekstrin, stivelse osv. i ren eller rå tilstand og som nitrogenkilde et organisk materiale såsom soyabønnemel, distillers's solubles, peanøttmel, bomullsfrømel, kjøttekstrakt, peptron, fiskemel, gjærekstrakt, maisstøpevæske osv. og om ønsket uorganiske nitrogenkilder såsom nitrater og ammoniumsalter og mineralsalter såsom ammoniumsulfat, magnesiumsulfat o.l. Det kan også inneholde natriumklorid, kaliumklorid, kaliumfosfat o.l. og pufferreagenser såsom natriumsitrat, kalsiumkarbonat eller fosfater og spormengder av tungmetallsalter. I ventilerte dypkulturprosesser brukes et antiskummiddel såsom flytende paraffin, fettoljer eller silikonforbindelser. Mer enn en type karbonkilde, nitrogenkilde eller antiskumkilde kan brukes for fremstilling av forbindelser X-14889 A-D.

De følgende eksempler vil tjene til å illustrere denne oppfinnelse uten å begrense den til dette.

Eksempel 1

Rystekolbefermentering av Streptomyces X-14889

X-14889 kulturen dyrkes og holdes på en stivelse-kasein-skråagar med følgende sammensetning (gram/liter destillert vann):

Oppløselig stivelse	10,0
Kasein	1,0
K_2HPO_4	0,5
$MgSO_4$ (vannfritt)	0,5
Agar	20,0

Juster til pH 7,4 med NaOH før autoklavering. Skråagaren inokuleres med X-14889 kultur og inkuberes ved 28°C i 10-14 dager. En slant agar inneholdende sporulert kultur fra skråagaren brukes så for å inokulere en 500-ml Erlenmeyer kolbe inneholdende 100 ml sterilisert inokulummedium med følgende sammensetning (gram/liter springvann):

Soylose 105	10,0
Cerelose	20,0
$CaCO_3$	0,2
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,001
Na_2SO_4	1,0

pH til 6.0 før sterilisering.

Den inokulerte kolbe inkuberes ved 28°C i 72 timer på en roterende ryster som går ved 250 opm med et 5 cm utslag. En 3-ml porsjon (3%, v/v) av den resulterende kultur brukes så til å inokulere en 500 ml Erlenmeyer kolbe inneholdende 100 ml sterilisert produksjonsmedium med samme sammensetning som inokulums medium. Den inokulerte kolbe inkuberes ved 28°C i 6 dager på en roterende ryster som går ved 250 opm med et 5 cm utslag.

Eksempel 2

Tankfermentering av Streptomyces X-14889

X-14889 kulturen dyrkes og holdes på en stivelse-kasein-skråagar som beskrevet i eksempel 1. Et stykke agar inneholdende den sporulerte kultur fra skråagaren brukes så til å inokulere en 6-liters Erlenmeyer kolbe inneholdende 2 liter medium med følgende sammensetning (i gram/liter springvann):

Soylose 105	10,0
Cerelose	20,0
$CaCO_3$	0,2
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,001
Na_2SO_4	1,0

pH til 6.0 før sterilisering i 45 minutter i en autoklav.

Den inokulerte kolben inkuberes ved 28°C i 5 dager på en roterende ryster som går med 250 opm med et 5 cm utslag. Fire liter av den resulterende kultur brukes som inokulum for å starte en fermentering i en 378 liter fermentor inneholdende 227 l medium med følgende sammensetning (gram/liter springvann):

Soylose 105	10,0
Cerelose	20,0
$CaCO_3$	0,2
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,0
Sag 4130 (Antiskum) (Enhetskarbid)	0,1

pH til 6.0 før sterilisering i 45 minutter med en 1,02 atm. damp.

Det inokulerte medium beluftes med trykkluft ved en hastighet på 85 liter pr. minutt og røres med rørere ved 280 opm. Fermenteringen utføres ved 28°C i 72 timer. 75 liter av den resulterende kultur brukes til å inokulere en 1890 liters fermentor inneholdende 1368 liter medium med

den følgende sammensetning (gram/liter springvann):

Soylose 105	**10,0**
Cerelose	**20,0**
$CaCO_3$	**0,2**
$CoCl_2 6H_2O$	**0,001**
Na_2SO_4	**1,0**
Sag 4130 Antiskum (Enhetskarbid)	**0,1**

pH til **6.0** før sterilisering i 45 minutter med en 1,02 atm. damp.

Den inokulerte fermentor beluftes med trykkluft ved 566 liter pr. minutt og røres med rørere ved 280 opm. Fermenteringen utføres ved 28°C i 139 timer.

Eksempel 3

Isolering av antibiotikum X-14889C-natriumsalt fra tankfermentering av Streptomyces kultur X-14389

All væsken (368 liter) fra 139 timers fermenteringen av Streptomyceskulturen sp. X-14889 ble ekstrahert to ganger med samme volumer etylacetat ved høstingstidspunktet pH (7,1). Løsningsmiddelsjiktet ble skilt fra og konsentrert under redusert trykk til en olje. Oljen ble oppløst i n-heksan og ekstrahert to ganger med samme volumer acetonitril. Den ekstraherte heksanfasen ble konsentrert under redusert trykk til en olje (70 g), og oppløst i 1,5 liter metylenklorid og vasket i rekkefølge med 0,5 liter 1N HCl, vann, mettet natriumkarbonat og vann. Løsningsmiddelsjiktet ble tørket over natriumsulfat og konsentrert under redusert trykk. Dette konsentratet ble kromatografert på en metylenkloridoppslemmet pakket 800 g kiselgel (Davison grad 62) kolonne. Kolonnen ble eluert med 4 liter metylenklorid, etterfulgt av 4 liter dietyleter-heksan (9:1). Fraksjoner av 40 ml hver ble samlet og fraksjon nummere 60-120 ble slått sammen og konsentrert under redusert trykk til en olje (6 g). Oljen ble oppløst i minimumsvolumet metylenklorid og så kromatografert på en metylen-

klorid oppslemmet-pakket 300 g kiselgel (Davison grad 62) kolonne. Kolonnen ble eluert med 2-liter metylenklorid og så en gradient mellom 4 liter dietyleter-n-heksan-aceton-ammoniumhydroksyd (7:3:1:0,02) og 4 liter dietyleter-aceton (9:1). Fraksjoner på 25 ml hver ble samlet. Fraksjon nummere 251-300 ble slått sammen, løsningsmiddelet fjernet under redusert trykk og resten ble oppløst igjen i etylacetat og i rekkefølge vasket med 1 N HCl, vann, mettet natriumkarbonat og vann og tørket over natriumsulfat. Løsningsmiddelet ble fjernet under redusert trykk og resten ble krystallisert fra dietyleter ved tilsetning av heksan, hvilket ga antibiotikum X-14889C-natriumsaltmonohydrat.

Smp. 139-141°C, $[\alpha]_D^{25}$ = 19.3°C (c1 i $CHCl_3$).
Mikroanalyse beregnet for: $C_{33}H_{57}O_{10}Na.H_2O$ (654.82):
Beregnet: %C, 60.53; %H, 9.08; %Na, 3.51; %H_2O, 2.75.
Funnet: %C, 60.99, 61.24; %H, 9.16, 8.79; %Na, 3.68; %H_2O, 2.00.

Strukturen ble bestemt med røntgenkrystallografi (antibiotikum X-14889C er en lavere homolog av Lysocellin).

Antibiotikum X-14889C viser antimikrobiell aktivitet mot en rekke organismer som vist i tabellen nedenunder.

*In vitro Mikroorganisme	Minimal inhiberende konsentrasjon (mcg/ml) X-14889C
G(+) cocci	
Streptococcus faecium ATCC 8043	0.08
Staphylococcus aureus ATCC 6538P	5
Micrococcus luteus ATCC 9341	5
G(+) staver	
Bacillus megaterium ATCC 8011	2.5
Bacillus sp. E ATCC 27359	0.63
Bacillus subtilis ATCC 558	1.25
Bacillus sp. TA ATCC 27860	1.25
G(+) tråder	
Mycobacterium phlei ATCC 355	50
Streptomyces cellulosae ATCC 3313	10
Muggsopp	
Paecilomyces varioti ATCC 28820	125
Penicillium digitatum ATCC 26821	250
Gjær	
Candida albicans NRRL 477	62.5
Saccharomyces cerevisiae ATCC 4226	500

* Som bestemt ved en agardiffusjonsbrønn metode.

Som ovenfor angitt har antibiotikumet i foreliggende oppfinnelse og saltene derav den egenskap at de negativt påvirker veksten av visse grampositive bakterier. De er anvendelige i vaskeløsninger for sanitærformål samt ved vasking av hender og rensing av utstyr, gulver og møbler i kontaminerte rom eller laboratorier.

Når de brukes som desinfeksjonsmiddel bør en fagmann ta i betraktning de minimale inhiberende konsentrasjoner for antibiotikumet ved utregning av antibiotikumkonsentrasjonen som skal brukes mot målorganismen.

Antibiotikum X-14889C viser også de følgende aktiviteter:

(A) Aktivitet mot svinedysenteri

Antibiotikum X-14889C natriumsalt viser in vitro aktivitet mot Treponema hyodysenteriae, en kilde til svinedysenteri, viser aktivitet ved 5 mcg/ml. Undersøkelse av aktivitet mot Treponema hyodysenteriae, en kilde til svinedysenteri, besto i inokulering av blodagarplater inneholdende en rekke av to fire gangers fortynninger av antibiotikumet og ipronidazol, et effektivt middel mot svinedysenteri med ti gangers fortynninger av hver av T. hyodysenteriae stammene (H 78, H 140, H 179). Etter 48 timers inkubering ved 42°C i en anaerob atmosfære, ble minimale inhiberende konsentrasjoner registrert som de laveste konsentrasjoner av forbindelsen som fullstendig inhiberte det sterkest fortynnede inokulum av hver T. hyodysenteriae stamme.

(B) Aktivitet mot Plasmodium berghei

Antibiotikum X-14889C natriumsalt viser in vitro aktivitet mot Plasmodium berghei ved en subkutan dose på 22 mg/kg.

(C) Aktivitet som for effektivitetsforsterker hos dyr

Antibiotikum X-14889C natriumsalt viser in vitro aktivitet som foreffektivitetsøker hos drøvtyggere. Ved 50

ppm av antibiotikumet var prosentdelen totale flyktige fettsyrer 154,3% mot 100% for kontroll i standard fistikulert ruminent modell.

Basert på in vitro resultatene ovenfor kan man på forhånd anta at administrering av antibiotikum X-14889C heretter kalt "Antibiotikum" eller "Antibiotikum forbindelse" forebygger og behandler ketose samt forbedrer forutnyttelsesgraden hos drøvtyggere eller svin. Årsaksmekanismen til ketose er en mangel i produksjon av propionatforbindelser. En i øyeblikket anbefalt behandling er administrering av propionsyre eller for som fortrinnsvis produserer propionater. Det er åpenbart at å stimulere propionatproduksjonen i ordinært for vil redusere ketosetilfeller.

Basert på in vitro resultatene vil man kunne forutse at antibiotikum X-14889C øker forutnyttelsesgraden hos drøvtyggende dyr som får dette gitt oralt. Den letteste vei å gi antibiotikum er å blande det inn i dyrets for.

Imidlertid kan antibiotikumet med hell gis på andre måter. F.eks. kan de innføres i tabletter, drageer, piller eller kapsler og doseres til dyrene. Formulering av den antibiotiske forbindelse i slike doseringsformer kan oppnås ved hjelp av velkjente metoder innenfor veterinærfarmasien.

Kapsler er lette å produsere ved å fylle gelatinkapsler med enhver ønsket form av det ønskede antibiotikum. Om ønsket kan antibiotikumet fortynnes med et inert pulverformig fortynningsmiddel såsom sukker, stivelse eller renset krystallinsk cellulose for å øke dets volum og derved lette fyllingen i kapsler.

Tabletter av antibiotikumet fremstilles ved vanlige farmasøytiske prosesser. Fremstilling av tabletter er velkjent og en høyt utviklet teknikk. I tillegg til den aktive bestanddel inneholder en tablett normalt en base, et sprengningsmiddel, et absorpsjonsmiddel, et bindemiddel og et smøremiddel. Typiske grunnlag er laktose, melis, natrium-

klorid, stivelse og mannitol. Stivelse er også et godt spreningsmiddel i likhet med alginsyre. Overflateaktive midler såsom natriumlaurylsulfat og dioktylnatriumsulfosuksinat brukes også noen ganger. Vanlige brukte absorbenter er igjen stivelse og laktose mens magnesiumkarbonat også kan anvendes for oljeaktige substanser. Meget brukte bindemidler er gelatin, gummier, stivelse, dekstrin og forskjellige cellulosederivater. Blant de vanligst brukte smøremidler er magnesiumstearat, talku, paraffinvoks, forskjellige metallsåper og polyetylenglykol.

Administreringen av den antibiotiske forbindelsen kan være som en langsomt avgivende pille. Slike piller lages som tabletter, bortsett fra at det foreligger et middel for å forsinke oppløsningen av antibiotikumet. Piller lages slik at de frigjør over lange tidsrom. Den langsomme oppløsning bevirkes ved å velge en meget vannuløselige form av antibiotikumet. En substans såsom jernspon brukes for å øke pillens densitet og holde den statisk på bunnen av vommen.

Oppløsning av antibiotikumet forsinkes ved bruk av en matrise av uløselige materialer som drogen er innstøpt i. F.eks. kan substanser såsom vegetabilske vokser, rensede mineralvokser og vann-uløselige polymermaterialer anvendes.

Drageer av antibiotkum fremstilles lettest ved å velge en vannløselig form av antibiotikumet. Hvis en uløselig form er ønsket av en eller annen grunn, kan man fremstille en suspensjon. Alternativt kan en dragee formuleres som en løsning i et fysiologisk akseptabelt løsningsmiddel såsom en polyetylenglykol.

Suspensjoner av uløselige former av antibiotikumet kan fremstilles i ikke-løsningsmidler såsom vegetabilske oljer slik som peanutt, mais eller sesamolje, i en glykol såsom propylenglykol eller en polyeterglykol; eller i vann avhengig av den valgte form av antibiotikumet.

Egnede fysiologisk akseptable hjelpestoffer er nødvendige for å holde antibiotikumet oppslemmet. Hjelpestoffene kan blant annet velges fra tykningsmidler såsom karboksymetylcellulose, polyvinylpyrrolidon, gelatin og alginater. Mange klasser overflateaktive midler tjener til å oppslemme antibiotikumet. F.eks. lecitin, alkylfenolpolyetylenoksydaddukter, naftalensulfonater, alkylbenzensulfonater og polyoksydetylensorbitanestere kan anvendes for å lage suspensjoner i flytende ikke-løsningsmidler.

I tillegg kan mange substanser som påvirker hydrofilisitet, densitet og overflatespenning for væsken bidra i fremstilling av suspensjoner i enkelte tilfeller. F.eks. kan silikonantiskummidler, glykolsorbitol og sukkere anvendes som oppslemmingsmidler.

Det suspenderbare antibiotikum kan gis til voksne dyr som en suspensjon, eller som en tørrblanding av antibiotikumet og hjelpestoffene for fortynning før bruk.

Antibiotikumet kan også gis i drikkevannet til drøvtyggerene. Innføring i drikkevannet utføres ved å tilsette en vannløselig eller vannsuspenderbar form av antibiotikumet til vannet i riktig mengde. Formulering av antibiotikumet for tilsetning til drikkevann følger de samme prinsipper som formulering av drageer.

Den mest praktiske måte å behandle dyr med antibiotikumforbindelsen er ved formulering av forbindelsen i fortilførselen. Alle typer for kan gis med de antibiotiske forbindelser, innebefattet vanlige tørrfor, flytende for og pelletert for.

Metodene for formulering av medikamentene i dyrefor er velkjente. Det er vanlig å fremstille konsentrert medikamentforblanding som et råmateriale for medikamenttilsatte for. F.eks. kan typiske medikamentforblandinger inneholde fra ca. 1 til 400 g droge pr. 450 g forblanding. Det brede

området følger av det brede konsentrasjonsområdet av medikamentet som kan være ønskelig i det ferdige for. Forblandinger kan enten være flytende eller faste.

Formuleringen av drøvtyggerforene som inneholder de riktige mengder av antibiotikumet for hensiktsmessig behandling er lett å finne ut. Det er bare nødvendig å beregne den mengde forbindelse som man ønsker å gi til hvert dyr, for å ta hensyn til den mengde for pr. dag som dyret spiser og konsentrasjonen av antibiotikumforbindelsene i forblandingen som skal brukes, og behandle den riktige konsentrasjon av antibiotikumforbindelsen eller av forblandingen i foret.

Alle metodene for formulering, blanding og pelletering av for som normalt brukes på området drøvtyggerfor er helt tilfredsstillende for fremstilling av for som inneholder den antibiotiske forbindelsen.

Som forventet ved in vitro resultatene, forandrer administrering av antibiotikumet på fordelaktig måte produksjonen av propionater i forhold til produksjonen av acetater i vommen. Man kan derfor postulere at den samme behandling også ville være fordelaktig for monogastriske dyr som fermenerer fiberaktig vegetabilsk materiale i cecum, da man kunne forvente at en fordelaktig forandring i propionat/acetatforholdet ville opptre etter oral administrering av det foreliggende antibiotikum. Hester, svin og kaniner er eksempler på dyr som fordøyer en del av sitt for ved cecal fermentering.

Innføringen av Antibiotikum X-14889C i enhver av de ovenfor beskrevne doseringsformer bør utføres under hensyntagen til in vitro nivå for aktivitet av 50 ppm angitt ovenfor og LD_{50} for forbindelsen angitt nedenunder.

Antibiotikum X-14889C har følgende toksisitet uttrykt som LD_{50}'er:

LD_{50}(PO) = 190 mg/kg
LD_{50}(IP) = 120 mg/kg

Forbindelsene X-14889A-D er polyeterforbindelser og danner en rekke farmasøytisk akseptable salter. Disse salter fremstilles fra den fri syreform av den spesielle forbindelse ved velkjente metoder; f.eks. ved å vaske den fri syre i løsning med en egnet base eller salt. Eksempler på slike farmasøytisk akseptable basiske substanser som er i stand til å danne salter for formålet av foreliggende oppfinnelse, er alkalimetallsalter såsom natriumhydroksyd, kaliumhydroksyd, litiumhydroksyd o.l.; jordalkalimetallbaser såsom kalsiumhydroksyd, bariumhydroksyd o.l.; og ammoniumhydroksyd. Alkalimetall eller jordalkalimetallsalter som er egnet for å danne farmasøytisk akseptable salter kan inneholder anioner såsom karbonater, bikarbonater og sulfater.

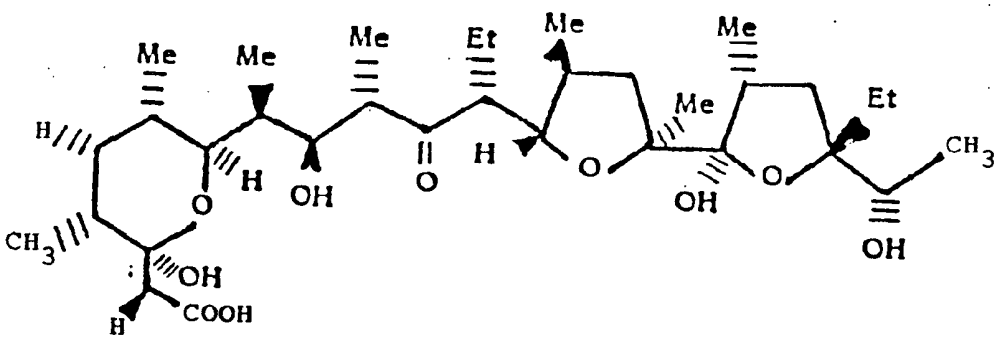
Eksempler på organiske baser som danner farmasøytisk akseptable salter med polyeterforbindelsene er lavere alkylaminer, primære, sekundære og tertiære hydroksy-lavere alkylaminer såsom etylamin, isopropylamin, dietylamin, metyl-n-butylamin, etanolamin og dietanolamin.

Et spesielt foretrukket amin er N-metylglukamin. Salter av N-metylglukamin er av spesiell verdi fordi de er vannløselige, hvilket gjør dem egnet for parenteral bruk.

Antibiotikum X-14889C viser også svak in vitro aktivitet ved 1 ppm som anticoccidiostatisk middel mot Eimeria tenella.

P a t e n t k r a v

Fremgangsmåte ved fremstilling av forbindelsen X-14889C med formel



I

samt farmasøytisk akseptable salter derav,
k a r a k t e r i s e r t v e d å dyrke stammen Streptomyces X-14889, NRRL 15517 i en vandig oppløsning inneholdende et nitrogenholdig næringsmiddel under neddykkede aerobiske betingelser og deretter isolere forbindelsen X-14889C fra oppløsningen og om ønsket konvertere forbindelsen til farmasøytisk akseptable syreaddisjonssalter.