(19) DANMARK

(12) **PATENTSKRIFT** (11) **167816 B1**

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: **5387/87**

(22) Indleveringsdag: **15 okt 1987**

(41) Alm. tilgængelig: **17 apr 1988**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **20 dec 1993**

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: **16 okt 1986 GB 8624806**

(51) Int.Cl.5 **C 07 K 9/00**
A 23 K 1/17
C 12 N 1/20
C 12 P 21/02
//(C 12 N 1/20,
C 12 R 1:045)

(73) Patenthaver: ***Pfizer Limited; Ramsgate Road; Sandwich; Kent, CT13 9NJ, GB**

(72) Opfinder: **Kelvin Scott *Holdom; GB, Hiroshi *Maeda; JP, John Cornish *Ruddock; GB, Junsuke *Tone; JP**

(83) **Deponering af mikroorganismer**

(74) Fuldmægtig: **Hofman-Bang & Boutard A/S**

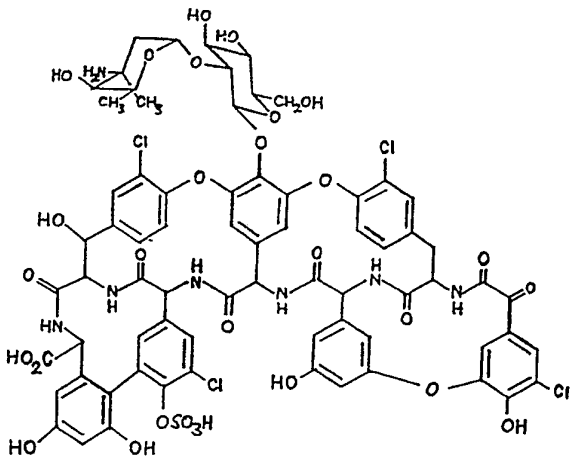
(54) **Glycopeptid antibiotikum, farmaceutisk acceptable kationssalte heraf, og fremgangsmåde til fremstilling deraf, fodermidler indeholdende dette antibiotikum og fremgangsmåde til at øge dyrs vækst/foderudnyttelse under anvendelse af fodermidlet samt biologisk ren kultur af nævnte antibiotikumproducerende stamme**

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

5387-87

Glycopeptid med formlen:



fortsættes

fremstilles ved aerobt at dyrke Actinoplanes sp. ATCC 53533 under neddykkede betingelser i vandigt næringssubstrat.

Den antibiotiske forbindelse er effektiv over for en række mikroorganismer og kan kontrollere cossidiosis, enteritis, svinedysenteri og theileriosis og fremme væksten og/eller foderudnyttelse hos de behandlede dyr.

Den foreliggende opfindelse angår et hidtil ukendt glycopeptid antibiotikum UK-68.597 og farmaceutisk acceptable kationssalte heraf, en gruppe forbindelser, der er karakteriseret biologisk ved deres gram-positive antibakterielle virkning, der skyldes hæmning af bakteriecellevægsbiosyntese. Opfindelsen angår også en fremgangsmåde til fremstilling af ovennævnte antibiotikum, fodermidler indeholdende dette samt fremgangsmåde til at forøge væksten hos dyr under anvendelse af fodermidlet. Endelig angår opfindelsen også en biologisk ren kultur af stammen ATCC 53 533 eller en UK 68 597 producerende mutant heraf).

Nævnte gruppe antibiotika omfatter velkendte midler, som avoparcin; actaplanin; teichoplanin; A41030 kompleks og aridicinerne. Emnet er omhandlet i en oversigtsartikel af Williams og Barna. "Structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group". Annual Rev. Microbiol., 38, 339, 1984.

Under eftersøgningen efter antibiotika har man forsøgt strukturelle modifikationer, når dette har været muligt. En sådan metode er imidlertid begrænset til modifikationer, der opretholder den ønskede aktivitet. Mange antibiotika, herunder glycopeptiderne, har en sådan kompleks opbygning, at selv små forandringer kan være vanskelige at foretage rent kemisk. Fundet af nye antibiotika frembragt ved forgæringsmetoder foregår stadig og er stadig af stor vigtighed, selv i de tilfælde, hvor antibiotikummet, når det først er fundet, er helt lig med et tidligere kendt antibiotikum.

Ovennævnte glycopeptid antibiotika er virksomme over for gram-positive bakterier. De kan derfor anvendes med varierende grad af succes til administrering til fjerkræ og andre husdyr, herunder drøvtyggere og svin, for at kontrollere infektioner og for at fremme vækst eller mælke-

produktion.

Blandt en række tilstande, der kan behandles med disse midler, er enteritis, en sygdom, der kan forårsage alvorlige økonomiske tab for husdyrproducenten. Enteritis forekommer hos kyllinger, svin, kvæg og får og skyldes især anaerobe bakterier, specielt Clostridium perfringens, og vira. Enterotoxemi hos drøvtyggere, og "forvommethed" hos får, er en sygdom forårsaget af C. perfringens infektion.

Forøgelse af udbytte (dvs. forøget vækst og/eller forøget udnyttelse af foderet) hos drøvtyggere, som f.eks. kvæg, og hos enmavede dyr, som svin, er et andet ønsket mål inden for veterinærvidenskaben. Af særlig interesse er den forøgede effektivitet opnået ved at øge foderudnyttelsen. Udnyttelsesmekanismen for hovednæringsdelene af drøvtyggernes foder er velkendt. Mikroorganismer i rumen hos dyret nedbryder kulhydrater til frembringelse af monosaccharider og omdanner disse monosaccharider til pyruvatforbindelser. Pyruvater metaboliseres ved mikrobiologiske processer til dannelse af acetater, butyrater eller propionater, samlet betegnet flygtige, fede syrer. Skønt acetater og butyrater anvendes, udnyttes propionater med større effektivitet. Yderligere kan dyrene, dersom der er for lidt propionat tilgængeligt, udvikle ketose. Et helbredende middel vil derfor stimulere dyrene til at frembringe en større del som propionat ud fra kulhydraterne, hvorved kulhydratudnyttelsen effektiviseres, og samtidig reduceres tilfældene af ketose.

Den foreliggende opfindelse angår et hidtil ukendt glycopeptid antibiotikum betegnet UK-68.597 og farmaceutisk acceptable kationsalte heraf, som er kendetegnet ved den i krav 1's kendetegnende del angivne formel. Det frembringes ved neddykket aerob propagering i vandige næringssubstrater af en mikroorganisme, der er isoleret fra en jordprøve fra San Diego, Californien, USA. Denne frem-

gangsmåde ifølge opfindelsen er kendetegnet ved den i krav 2's kendetegnende del angivne fremgangsmåde. Dette antibiotikum er virksomt over for en hel række mikroorganismer og er i stand til at fremme vækst og forøge foderudnyttelsesgraden hos fjerkræ, svin og drøvtyggere.

Mikroorganismen er i nærværende beskrivelse med krav betegnet Actinoplanes sp. ATCC 53533. Man har fundet, at den hører til en art af Actinoplanes på grund af dens smalle hyfer, gul-orange til orange substratmycelium og sammensætningen af helcelle aminosyrerne og sukkerarterne.

Mikroorganismen ifølge opfindelsen er kendetegnet ved, at den er stammen Actinoplanes ATCC 53.533 eller en UK-68.597 - producerende mutant heraf.

En kultur heraf betegnet N693-3 blev udsået fra en skråagar på ATCC nr. 172 bouillon og dyrket i fire dage ved 28 °C, og resultaterne blev aflæst på forskellige tidspunkter, men sædvanligvis efter 14 dages forløb. Farverne blev beskrevet i almindelig terminologi, men nøjagtige farver blev bestemt ved sammenligning med farvestrimler fra Colour Harmony Manual, fjerde udgave. Analysemetoderne for helcelle aminosyrer og sukkerarter er de, der er beskrevet i Becker, B. et al., Appl. Microbiol. 12, 421-423, 1964; og i Lechevalier, M.P., J. Lab. Clin. Med., 71, 934-944, 1968.

De anvendte identifikationssubstrater til karakterisering af kulturen og deres sammensætning er følgende:

1. Trypton-gærekstrakt bouillon (ISP substrat nr. 1, Difco).

2. Gærekstrakt-maltekstrakt-agar (ISP substrat nr. 2, Difco).

3. Havremelsagar (ISP substrat nr. 3, Difco).

4. Uorganiske salte-stivelsesagar (ISP substrat nr. 4, Difco).

5. Glycerol-asparagin-agar (ISP substrat nr. 5, Difco).

6. Pepton-gærekstrakt-jern-agar (ISP substrat nr. 6, Difco).

7. Czapek-saccharose-ager - S.A. Waksman, The Actinomycetes, Vol. 2, substrat nr. 1, p. 328, 1961.

8. Glucose-asparagin-agar - Ibid, substrat nr. 2, p. 328.

9. Bennett's agar - Ibid, substrat nr. 30, p. 331.

10. Emerson's agar - Ibid, substrat nr. 28, p. 331.

11. Næringsagar - Ibid, substrat nr. 14, p. 330.

12. Gærekstrat-agar - Ibid, substrat nr. 29, p. 331.

13. Pepton-Czapek-agar - J.N. Couch, J. Elisha Mitchell Soc., 79, 53-70, 1963.

14. Hickey og Tresner's agar - R.J. Hickey og H.D. Tresner, J. Bacteriol., 64, 891-892, 1952.

15. Gordon og Smith's tyrosin-agar - R.E. Gordon - R.E. Gordon og M.M. Smith, J. Bact., 69, 147-150, 1955.

16. Kasein-agar - Ibid.

17. Calcium-maleat-agar - S.A. Waksman, Bact. Rev., 21, 1-29, 1957.

18. Gelatine-agar - R.E. Gordon og J.M. Mihm, J. Bact., 73, 15-27, 1957.

19. Stivelses-agar - Ibid.

20. Organisk nitratbouillon - Ibid.

21. Kartoffel-gulerods-agar - M.P. Lechevalier, J.Lab. og Clin. Med. 71, 934,044, 1968, men kun 30 g kartofler, 2,5 g gulerødder og 20 g agar.

22. 2% postvands-agar.

23. Dextrose-nitrat-bouillon - S.A. Waksman, The Actinomycetes, Vol. 2, substrat nr. 1, p. 328, 1961, med 3 g dextrose i stedet for 30 g saccharose og uden agar.

24. Cellulose udnyttelse

    (a) H.L. Jensen

    (b) M. Levine og H.W. Schoenlein. A Compilation of Culture Media, substrat nr. 2511, 1930.

25. Skummetmælk - Difco.

26. Kulhydrater - G.M. Luedemann og B.C. Brodsky, Abtimicrob. Agents Chemother., 1964,47, 1965, ISP substrat nr. 9, Difco.

27. Temperaturområde - ATCC substrat 172 i ATCC substrathåndbog, 1. udgave, p. 10, 1984.

Udseende og vækst på substraterne var følgende:

Gærekstrakt-maltekstrakt-agar

God vækst, orange til gullig-orange (5ia, 51a, 4ga), rynket, ophøjet, intet luftmycelium; på bagsiden det samme som overfladen; intet opløseligt pigment.

Havremels-agar

Vækst moderat til god, creme men svagt gullig-orange mod kanten, moderat ophøjet, glat, intet luftmycelium; bagsiden svagt gullig-orange (3ca,3ea); intet opløseligt pigment.

Uorganiske salte - stivelsesagar

Moderat vækst, gullig-orange (4ea, 4ga), glat, svagt ophøjet, intet luftmycelium; bagsiden som overfladen; intet opløseligt pigment.

Glycerol-asparagin-agar

God vækst, orange til mørk-orange (41a, 51a), rynket, ophøjet, intet luftmycelium; bagsiden som overfladen; intet opløseligt pigment.

Czapek-saccharose-agar

Moderat vækst, svagt gullig-orange (3ca), glat, let ophøjet, intet luftmycelium; bagsiden svagt gullig-orange (3ca, 3ea); intet opløseligt pigment.

Glucose-asparagin-agar

Moderat til god vækst, orange (4ga, 4ia), glat, men rynket ud mod kanten, moderat ophævet, intet luftmycelium; bagsiden orange (4ia, 41a), intet opløseligt pigment.

Bennett's agar

God vækst, gullig-orange (4ia, 4pa), rynket, ophævet, intet luftmycelium; bagsiden gullig-orange (41a, 4pa); intet opløseligt pigment.

Emerson's agar

God vækst, rødlig orange (6ia, 6½a), rynket, ophævet, intet luftmycelium; bagsiden som overfladen; opløseligt pigment gullig-brunt (41c).

Nærings-agar

Dårlig til moderat vækst, rødlig-orange (5ea, 5ga, 6ga), glat men rynket mod slutningen af udstrygningen, tynd men ophævet mod slutningen af udstrygningen, intet luftmycelium; bagsiden som overfladen; intet opløseligt pigment.

Glucose-gærekstrakt-agar

Glimrende vækst, orange (41a, 51a), rynket, svagt ophævet, intet luftmycelium; bagsiden som overfladen; opløseligt pigment gulligbrunt (31c).

Pepton-Czapek-agar

Spredt vækst, gullig-orange (4ia), granulær, ophævet, intet luftmycelium; bagsiden som overfladen; intet opløseligt pigment.

Hickey og Tresner's agar

God vækst, gullig til gullig-orange (3ea, 3ia, 4ia), rynket, ophævet, intet luftmycelium; bagsiden som overfladen; intet opløseligt pigment.

Gordon og Smith's tyrosin-agar

Moderat vækst, mørk rødlig (61e, 6½1e), glat, men rynket mod afslutningen af udstrygningen, tynd til svagt ophævet, intet luftmycelium; bagsiden brun til rødbrun (51e, 61a); opløseligt pigment mørkebrunt (5ng).

Kasein-agar

Moderat til god vækst, klart orange (5na, 5pa), rynket, moderat ophævet, intet luftmycelium; bagsiden som overfladen; opløseligt pigment gulligt (21c).

Calciummaleat-agar

Dårlig til moderat vækst, svagt gul-orange (3ea, 4ea), glat, tynd, intet luftmycelium; bagsiden som overfladen; intet opløseligt pigment.

Gelatine-agar

Moderat til god vækst, orange (5ga, 5ia), rynket, moderat ophævet, intet luftmycelium; bagsiden som overfladen; intet opløseligt pigment.

Stivelses-agar

God vækst, orange (5ia), rynket, ophævet, intet luftmycelium; bagsiden orange (5ia, 6ga); intet opløseligt pigment.

Kartoffel-gulerods-agar

Moderat vækst, orange-gul (3ea, 3ga), glat, tynd, intet luftmycelium; bagsiden som overfladen; intet opløseligt pigment.

Postevands-agar

Dårlig til moderat vækst, cremefarvet (2ca); glat, tynd, intet luftmycelium; bagsiden farveløs til cremefarvet (2ca); intet opløseligt pigment.

Morfologiske egenskaber

Vegetative hyfer smalle, lige eller bølgede, forgrenede, 0,4-1,0 m diameter, ingen sporer eller sporangier var frembragt efter syv ugers inkubation ved enten 21 °C eller 28 °C på havremels-agar, glycerol-asparagin-agar, Czapek-saccharose-agar, glucose-gærekstrakt-agar og på Hickey og Trenscher's agar blev der ikke frembragt sporer eller sporangier.

Biokemiske egenskaber

Melanin produceredes ikke i trypton-gærekstrakt-bouillon; hydrogensulfid produceredes på pepton-gærekstrakt-jern-agar. Gelatine blev flydende; stivelse hydrolyseredes; nitrat reduceredes til nitrit i både uorganisk nitrat-bouillon og dextrose-nitratbouillon; god vækst, men intet henfald på begge cellulose-bouilloner; koagulering og klaring på mælk; kaseinnedbrydning positiv; nedbrydning af kaliummaleat negativ; nedbrydning af tyrosin negativ. Kulhydratanvendelse: glucose, arabinose, fructose, inositol, mannitol, raffinose, rhamnose, saccharose, xylose, cellobiose, dulcitol, galactose, glycerol, lactose, mannose, melezitose, melibiose, ribose, salicin, opløselig stivelse, sorbitol og trehalose anvendtes; adonitol og sorbose blev ikke nedbrudt.

TEMPERATURFORHOLD

21 °C	28 °C	37 °C	45 °C
Glimrende vækst	Glimrende vækst	God til glimrende vækst	Ingen vækst

Cellevægsanalyse

Hydrolysater af hele celler indeholdt 3-hydroxydiaminopimelinsyre, xylose, arabinose, glucose, mannose og ribose.

Kulturen N693-3 er karakteriseret ved gul-orange til orange substratmycelium, uden sporer eller sporangier og uden opløselige pigmenter på de fleste af de anvendte substrater. Forsøg på at inducere sporer eller sporangieproduktion lykkedes ikke. Negative reaktioner omfatter melaninproduktion, henfald af cellulose, nedbrydning af calciummaleat eller tyrosin, anvendelse af adonitol og sorbose og vækst ved 45 °C. Følgende reaktioner er positive: gelatine flyder, stivelse hydrolyseres, nitrat reduceres, vækst på cellulose, koagulering og klaring på mælk, nedbrydning af kasein; anvendelse af alle sukkerarter bortset fra adonitol og sorbose; vækst ved 21 °C, 28 °C og 37 °C. Tilstedeværelsen af 3-hydroxydiaminopimelinsyre, xylose, arabinose, mannose og ribose indicerer, at kulturen hører til cellevægstype II.

Da den undersøgte kultur ikke producerer sporangier, og da inddeling i species af slægten Actinoplanes afhænger af størrelsen og udformningen af sporangierne, er identifikation af kulturen på speciesniveau umulig, og kulturen N693-3 betragtes derfor som en species af slægten Actinoplanes og betegnes Actinoplanes sp. Den er deponeret i American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive,

Rockville, Maryland 20852, U.S.A. under Budapesttraktaten den 3. september 1986 under registreringsnummeret ATCC 53533.

Dyrkning og isolering af antibiotikum UK-68.597 kan udføres under samme betingelser som de, der sædvanligvis anvendes til frembringelse af antibiotika ved forgæring. Dyrkningen foretages fortrinsvis i vandigt næringssubstrat under neddykkede aerobe betingelser under omrøring ved en temperatur på 24 til 36 °C. Næringssubstratet til dyrkning omfatter en assimilerbar kilde for carbon, som sukkerarter, stivelsesarter og glycerol; en kilde for organisk nitrogen, som kasein, enzymatisk nedbrudt kasein, sojabønnemel, bomuldsfrømel, jordnøddemel, hvedegluten, sojamel, kødmel og fiskemel. Kilder for vækstsubstanser, som f.eks. majsstøbevæske, fiskemel, bomuldsfrømel og gærekstrakt såvel som mineralsalte, som natriumchlorid og calciumcarbonat og sporstoffer, som jern, magnesium, kobber, zink, kobolt og magnesium, kan også anvendes med heldige resultater. Dersom der forekommer for meget skumning under forgæringen, kan antiskummemidler, som polypropylenglycoler eller siliconer, tilsættes forgæringssubstratet. Gennemluftning af substratet i tankene til neddykket vækst opretholdes fortrinsvis med en hastighed på ca. ½ til 2 rumfang steril luft pr. rumfang forgæringsbouillon pr. minut tilført bouillonen via en gennemlufter. Omrøringen kan opretholdes ved hjælp af omrørere, der er almindelige inden for forgæringsområdet. Omrøringshastigheden afhænger af den anvendte type omrører. En rystekolbe behandles sædvanligvis med 150 til 200 bevægelser pr. minut, medens en fermentor sædvanligvis kører med 300 til 1700 omdrejninger pr. minut. Aseptiske betingelser skal naturligvis opretholdes under overførslen af organismen og under dennes vækst.

Inokulum til fremstilling af det omhandlede antibiotikum kan fås ved at anvende væksten fra en skråagar af en kul-

tur eller fra Roux-kolber inokuleret med kulturen. Et fast substrat, der er velegnet til den første dyrkning af organismerne på skråagaren og i Roux-kolberne er ATCC substrat nr. 172. Væksten kan anvendes til at inokulere enten kolber eller inokulum-tanke, eller inokulum-tanke kan tilsås direkte fra rystekolberne. Væksten i rystekolberne når sædvanligvis maksimum i løbet af 4 til 5 dage, medens inokulum i neddykkede inokulum-tanke sædvanligvis vil være i den mest anvendelige tilstand i løbet af 3 til 6 dage.

Fremadskriden af antibiotikumproduktion under forgæring og bioaktiviteten af forgæringsbouillonen kan kontrolleres ved hjælp af biologisk undersøgelse af bouillonen, under anvendelse af en følsom stamme af Staphylococcus aureus eller Bacillus subtilis. B. subtilis ATCC 6633 er en velegnet stamme til dette formål. Standardpladeforsøgsmetoden anvendes, hvor hæmningszonen omkring en filtrerpapirskive mættet med bouillonen anvendes til at måle den antibiotiske åktivitet. Tyndtlagskromatografi under anvendelse af silicagel er også et værdifuldt værktøj til at afsløre de frembragte antibiotika i forgæringssubstratet og analysere sammensætningen af de urensede og rensede materialer, der ekstraheres fra forgæringsbouillonerne. Kromatogrammerne fremkaldes med acetonitril, vand, ammoniumhydroxid (3:1:7), og den fremkaldte plade dækkes med agar tilsået med enten S. aureus eller B. subtilis og inkuberes ved 37 °C i 16 timer for at visualisere de antibiotiske forbindelser.

Antibiotikum UK-68.597 frembragt ved forgæring af Actinoplanes sp. ATCC 53533 kan fraskilles og fjernes ved justering af pH af hele bouillonen til pH 10 og filtrere bouillonen for at fjerne myceliet. Antibiotikummet kan yderligere renses ved en række adsorptioner på passende adsorbenter, som f.eks. ionbytterharpikser, kemisk modificeret hydrofobe uorganiske understøttelseselementer,

som anvendes ved højtryks omvendt fase væskekromatografi eller højporøsitetspolymere, idet den antibiotiske forbindelse i hvert tilfælde elueres med et passende opløsningsmiddel.

Den omhandlede antibiotiske forbindelse er sur og danner kationsalte ved omsætning med basiske midler. Alle sådanne salte falder inden for den foreliggende opfindelses rammer.

Antibiotikum UK-68.597 kan karakteriseres ved hjælp af følgende fysisk-kemiske egenskaber.

A) Ultraviolet absorptionsspektrum. Forbindelserne udviser følgende absorptions-maksima:

Opløsningsmiddel	λ max (nm)
a) methanol	238, 280, 370
b) methanol, 0,1 M HCl (9:1)	238, 286
c) methanol, 0,1 M NaOH (9:1)	264, 300, 358

B) Infrarødt absorptionsspektrum. Forbindelsen udviser følgende maksima (cm^{-1}): 3700-3100; 1660; 1595; 1500; 1230; 1140; 1055; 1015; 990; 755.

C) Optisk drejning: [α] 250/D = -25,6° (c = 0,1, DMSO).

D) Tilbageholdelsestid (Rt) på 12,4 minutter, når der analyseres ved omvendt fase HPLC under følgende betingelser:

Søjle: C-18 Micro-Bondapack, 3,9 mm (i.d.) x 150 mm (Waters).

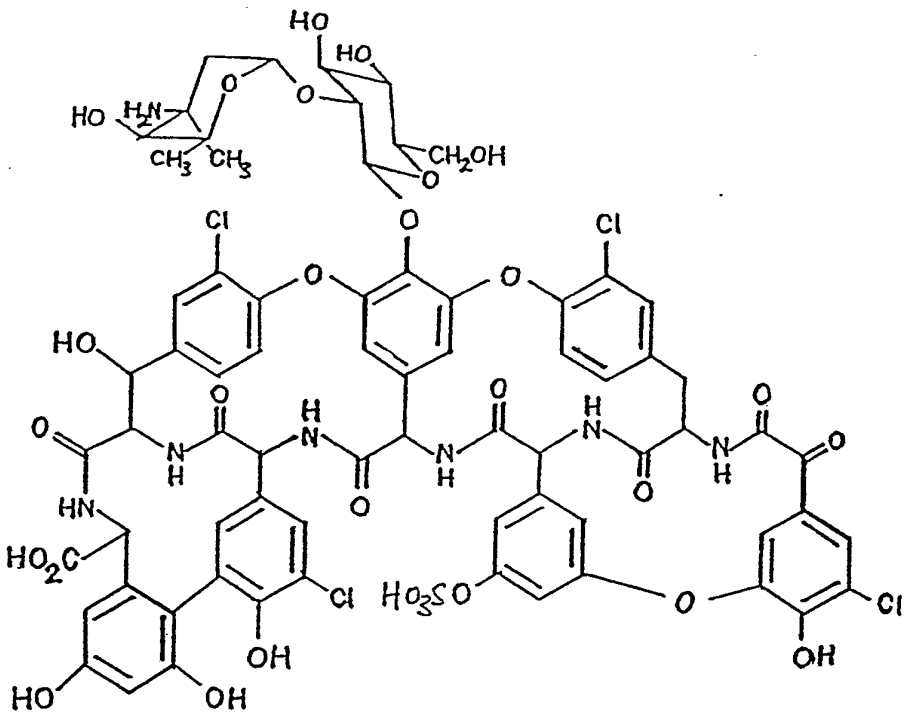
Elueringsmiddel: CH_3CN 10%, 0,1 M vandig ammoniumformiat 90%, indstillet til pH 7,4.

Gennemstrøm-
ningshastighed: 2 ml/min.

Visualisering: U.V. ved 225 nm.

E) Molekylvægt afledt fra hurtigt atombombardementsmasse-spektrum, der viser M+ top ved m/e 1651.

På basis af det kernemagnetiske resonansspektrum sammen med massespektroskopi har man fastlagt følgende formel for UK-68.597:



Antibiotikum UK-68.597 udviser hæmmende virkning over for væksten af en række gram-positive mikroorganismer. Tabel I nedenfor angiver resultaterne af in vitro-forsøgene. Til dette forsøg inokuleres hver organisme i en række reagensglas indeholdende næringssubstrat og varierende koncentrationer af antibiotikum UK-68.597 for at bestemme den minimale koncentration af forbindelsen mcg/ml, der

hæmmer væksten af organismen over en periode på 24 timer (MIC).

TABEL I

Antibakteriel virkning

Organisme	Stamme nr.	MIC, mcg/ml antibiotisk UK-68.597
Staphylococcus aureus	01A106	12,5
	01A539	12,5
	01A540	12,5
Actinomyces pyogenes	14D011	<0,2
Pasteurella multocida	59A006	>100
Clostridium perfringens	10A009	<0,2
Bacteroides fragilis	78C024	>100
Fusobacterium necrophorum	84C004	>100
Treponema hyodysenteriae	94A007	>100

Over for gram-negative bakterier, som Escherichia coli og Pseudomonas aeruginosa, var MIC-værdierne i hvert tilfælde >100.

Opfindelsen angår også et fodermiddel til fjerkræ, svin og kvæg, der er ejendommeligt ved det i krav 5's kendetegnende del angivne.

Herudover angår opfindelsen en fremgangsmåde til at fremme væksten og/eller forøge foderudnyttelsen hos svin og kvæg, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved det i krav 6's kendetegnende del angivne.

Dyrefoders værdi er generelt blevet bestemt direkte ved fodring til dyr. Engelsk patentskrift nr. 1 197 826 beskriver detaljeret en in vitro vommetode, hvor forandringer, der forekommer i foderet, frembragt af mikroorganismer, måles lettere og med større nøjagtighed ved vurdering af dyrefoder. Denne metode indebærer anvendelsen af et apparat, hvori dyrenes fordøjelsesprocesser udføres og undersøges in vitro. Dyrefoderne, vominokulum og forskellige vækstfremmere indføres og fjernes fra en laboratorieenhed under omhyggeligt kontrollerede betingelser, og de forandringer, der sker, undersøges omhyggeligt og fortløbende under mikroorganismernes nedbrydning af foderet. En forøgelse af propionsyreindholdet i vomvæsken indicerer, at der er sket et ønskeligt respons på drøvtyggerens totale tilstand fremkaldt af vækstfremmeren i foderet. En forandring i propionsyreindholdet udtrykkes som en procentdel af propionsyreindholdet fundet i kontrolvomvæsken. Langtids in vivo fodringsundersøgelser anvendes til at påvise en ægte korrelation mellem stigningen i propionsyre i vomvæsken og forbedret trivsel af dyret.

Vomvæsken opsamles fra en ko med fistel, der fodres en kommerciel opfedningsdiæt plus hø. Vomvæsken filtreres straks gennem osteklæde, og 10 ml sættes til en 50 ml konisk kolbe indeholdende 400 mg standardsubstrat (69% majsstivelse + 17% cellulose + 15% ekstraheret sojabønnemel), 10 ml af en pH 6,8 puffer og forsøgsforbindelsen. Kolben gennemluftes med oxygenfri nitrogen i ca. 2 minutter og inkuberes i et rystebad ca. 16 timer ved 39 °C. Alle forsøg udføres tre gange.

Efter inkubation blandes 5 ml af prøven med 1 ml 25% metaphosphorsyre. Efter 10 minutters forløb tilsættes 0,25 ml myresyre, og blandingen centrifugeres 10 minutter ved 1500 omdrejninger pr. minut. Herefter analyseres prøverne ved gas-væske-kromatografi således som beskrevet af D.W. Kellog, J. Dairy Science, 52, 1690, 1969. Højden af top-

pene for eddikesyre, propionsyre og smørsyre bestemmes for prøver fra ubehandlede og behandlede inkubationskolber.

Når der undersøges ved denne in vitro metode, foranlediger antibiotikum UK-68.597 i en mængde på 10 mikrogram pr. milliliter en forøgelse på ca. 25% i produktionen af propionsyre i forhold til, hvad der frembringes i kontroloplø sningen uden tilsat antibiotikum UK-68.597. Ved sammenligning med den kommercielt tilgængelige forbindelse salinomycin (et polyether-antibiotikum) i en mængde på 10 mcg/ml frembringes ca. en 46% stigning af propionsyren i forhold til kontrollen.

Disse resultater viser, at antibiotikum UK-68.597 vil forbedre foderudnyttelsen hos drøvtyggere, som f.eks. kvæg og får. Forbindelserne vil også have en lignende virkning på enmavede dyr, som svin og fjerkræ.

Som vist i tabel II er antibiotikum UK-68.597 i stand til at forbedre vækstforøgelsen og foderudnyttelsen hos fjerkræ.

Forbindelsen sattes til foderet, der gives til fire dage gamle kyllinger, der var anbragt i udrugningsbure over hinanden, idet de havde fri adgang til foder. Efter ti dages forløb blev fuglene vejet, og den levende vægtforøgelse sammenlignet med en ubehandlet kontrolgruppe, hvorved man opnåede en procentvis forbedring i den levende vægtforøgelse. Mængden af forbrugt foder divideres med den levende vægt af dyrene i den pågældende gruppe ved forsøgets afslutning til opnåelse af et foderomdannelsesforhold (der giver et mål for den vægt af foder, der er nødvendig for at frembringe 1 kg forøgelse i legemsvægten), og denne sammenlignes også med kontrolgruppen, og forbedringen i foderomdannelsesforholdet beregnes som en procentdel. Resultaterne viser en signifikant forbedring

både med hensyn til forøgelse af levende vægt og i foderomdannelseseffektiviteten, dersom antibiotikum UK-68.597 tilsættes foderet i en mængde på 10 ppm:

TABEL II

Forøgelse i ydelse af fjerkræ ved opdræt

Ppm	Forøgelse i levende vægt (% forbedring)	Foderomdannelses-forhold (% forbedring)
10	4,3	2,7

Antibiotikum UK-68.597 kan inkorporeres i foderpræparater i form af den fri syre eller som et salt. Alternativt kan urensede former af antibiotikum UK-68.597 eller tørret forgæringsbouillon indeholdende de antibiotiske forbindelser indarbejdes i fodermidler til opnåelse af den ønskede aktivitet af det pågældende antibiotikum.

Opfindelsen illustreres nærmere i de følgende eksempler.

EKSEMPEL 1

1. Fremstilling af inokulum

Et sterilt vandigt substrat med følgende sammensætning fremstilledes:

Bestanddel	Gram/liter
Glucose	1
Stivelse	24
Pepton	5
Gærekstrakt	5

Kødekstrakt	3
Calciumcarbonat	4

En liter af substratet fordeles i 2,8 liters koniske kolber og steriliseres ved 120 °C i 30 minutter ved 15 p.s.i. Efter afkøling inokuleres substratet med en vegetativ cellesuspension fra en skråagarkultur af Actinoplanes sp. ATCC 53533.

Kolberne rystes ved 28 °C på et roterende rystebord med en forskydning på 4-7 cm og 150-200 rystelser pr. minut i 3-5 dage.

2. Forgæring og isolering af antibiotikum UK-68.597

50 ml af inokulum-substratet beskrevet i eksempel 1 anvendtes til at inokulere hver af ni 5 liters forgæringsbeholdere indeholdende 2,5 liter sterilt substrat med følgende sammensætning, hvortil var sat 1 ml polypropylenglycol antiskummiddel:

Bestanddel	Gram/liter
Cerelose	10,0
Majsstivelse	10,0
Sojamel	10,0
Mask	5,0
Natriumchlorid	5,0
Calciumcarbonat	5,0
Koboltchlorid	1,0
Vand indtil 1 liter	
pH 6,9-7,0	

Forgæringen udførtes ved 28 °C under omrøring med 1500 omdrejninger pr. minut og gennemluftning med 1 rumfang luft pr. rumfang bouillon pr. minut, indtil der observeredes væsentlig aktivitet (baserer på det antibiotiske

filtrerpapir-skiveforsøg over for B. subtilis ATCC 6633), sædvanligvis 4-6 dage. Bioaktiviteten af bouillonen og af efterfølgende udvindelsesstrømme fulgtes ved hjælp af en følsom stamme af Bacillus subtilis ATCC 6633 eller Staphyloccocus aureus ATCC 6538. Den antibiotiske komponent i bouillonen og udvindelsesstrømmene afsløredes efter kromatografisk adskillelse under anvendelse af silicagelplader fremkaldt med acetonitril, vand, ammoniumhydroxid (3:1:0,7). Pladerne visualiseredes med UV-lys ved 254 nm og dækkedes herefter med agar, tilsåedes med enten S. aureus eller B. subtilis, hvortil 1,0 ml af en 1% opløsning af 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid sattes, og der inkuberedes i 16 timer ved 37 °C for at visualisere den antibiotiske forbindelse, som et hvidt område mod en lyserød baggrund.

Efter afslutningen af forgæringsproduktionstrinnet indstilledes bouillonen fra alle fermentorer til pH 10 og filtreredes for at udvinde myceliet. Den antibiotiske forbindelse UK-68.597 adsorberedes på en affinitetssøjle bestående af en D-alanyl-D-alanin-ligand immobiliseret på en agarose-matrix (som beskrevet i europæisk patentskrift nr. 0132117), og der elueredes med en blanding af acetonitril og 0,1 N ammoniumhydroxid (30:70). Yderligere rensning under anvendelse af væskekromatografi med høj ydeevne under anvendelse af silaniseret silicagel som understøttelse og acetonitril, 0,1 M vandig ammoniumformiat (pH 7,3) (1:9) som elueringsmiddel gav UK-68.597 i ren form.

EKSEMPEL 2

To liter af inokulummet fremstillet som beskrevet i eksempel 1 anvendtes til at inokulere 70 liter inokulumsubstrat med sammensætning som beskrevet i eksempel 1 anbragt i en 100 liters fermentor. Dette andet trins inokulum inkuberedes ved 28 °C med en omrøringshastighed på

450 omdrejninger pr. minut og en luftgennemstrømningshastighed på 1 rumfang luft pr. rumfang bouillon pr. minut. Efter 48 timers inkubation anvendtes inokulum til at inokulere 1200 liter substrat med følgende sammensætning anbragt i en 2.000 liters fermentor:

Bestanddel	Gram/liter
Cerelose	10
Majsstivelse	10
Sojamel	10
Kobaltchlorid	0,002
Mask	0,5
Natriumchlorid	5
Calciumcarbonat	1

Fermentoren holdtes på 28 °C under gennemluftning og omrøring ved 600 omdrejninger pr. minut. Efter 96 timer indstilledes hele bouillonens pH til pH 10,0, og der filtreredes gennem en filterpresse forbeklædt med filterhjælp. Det faste materiale indeholdende mikroorganismerne bortkastedes, og filtratet indstilledes til pH 7,0. Filtratet ledtes gennem en søjle af Amberlite® XAD-2 (Rohm & Haas), søjlen vaskedes med vand, og antibiotikum UK-68.597 elueredes med 50% vandig acetone.

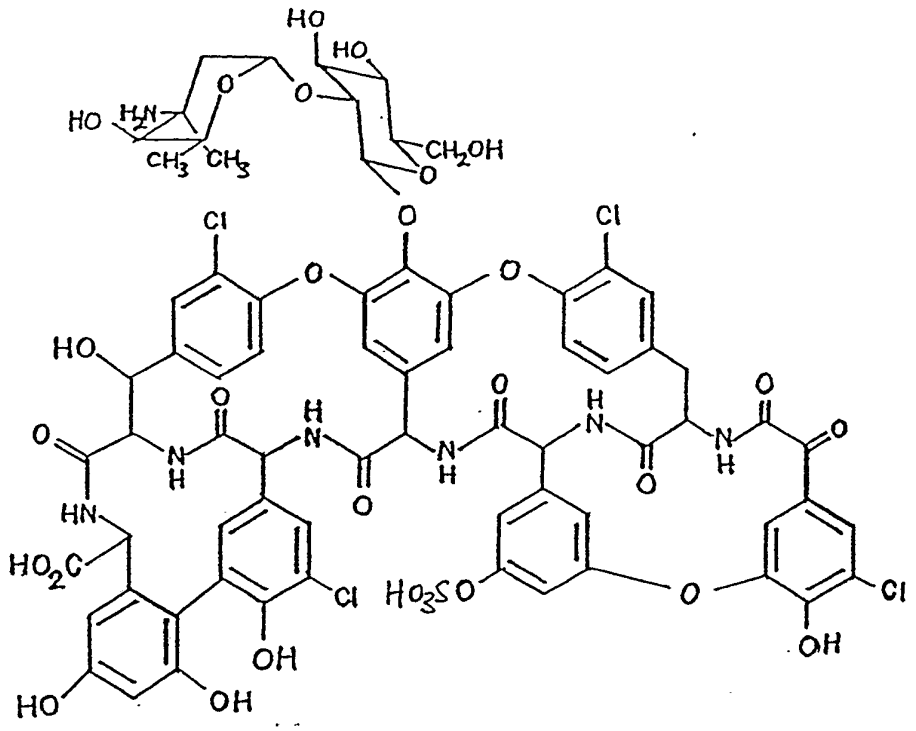
Eluatet koncentreredes til 12 liter. Efter fortynding med 1,75 liter 0,1 M vandig ammoniumformiat, anbragtes 3,5 liter af dette koncentrat på en C-18 Pre-Pak søjle i et Waters prep 500 højtryksvæskekromatografisystem. Søjlen elueredes efter hinanden med følgende opløsningsmidler:

Opløsningsmiddel	Rumfang liter
0,1 M vandig ammonium-formiat	3
0,1 M vandig ammonium-formiat, acetonitril (1:19)	4,5
0,1 M vandig ammonium-formiat, acetonitril (1:9)	1,3
Vand	0,9
Acetonitril i vand (3:7)	5,5

De antibiotikumrige fraktioner koncentreredes og adsorberedes på Amberlite® XAD-2 harpiks. Eluering af harpiksen under anvendelse af 50% vandig acetone, koncentrering af de relevante fraktioner og lyofilisering gav UK-68.597 i saltfri form.

P a t e n t k r a v :

1. Den antibiotiske forbindelse UK-68.597, k e n d e - t e g n e t ved, at den har formlen:



eller et farmaceutisk acceptabelt kationsalt heraf.

2. Fremgangsmåde til fremstilling af den antibiotiske forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at man dyrker mikroorganismen Actinoplanes sp. ATCC 53533 eller en UK-68.597-producerende mutant heraf med evne til at producere den antibiotiske forbindelse ifølge krav 1 i vandigt dyrkningssubstrat indeholdende en assimilerbar carbonkilde, nitrogen og uorganiske salte under neddykkede aerobe forgæringsbetingelser, indtil der opnås en udvindelig mængde af den antibiotiske forbindelse.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at den antibiotiske forbindelse fraskilles forgæringssubstratet.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at den antibiotiske forbindelse udvindes som et myceliepræparat eller ved at spraytørre hele forgæringssubstratet.

5. Fodermiddel til fjerkræ, svin eller kvæg, k e n d e t e g n e t ved, at foderet indeholder den antibiotiske forbindelse ifølge krav 1 i en tilstrækkelig mængde til at fremme vækst og/eller forbedre foderudnyttelse og fremme væksten af kvæg eller svin eller kontrollere coccidioseinfektioner hos fjerkræ.

6. Fremgangsmåde til at fremme vækst og/eller forøge foderudnyttelse hos svin eller kvæg, k e n d e t e g n e t ved, at man til svin eller kvæg administrerer en vækstfremmende eller foderudnyttelseseffektivitetsfremmende mængde af den antibiotiske forbindelse ifølge krav 1.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at den antibiotiske forbindelse administreres til svin eller kvæg ved at sætte den antibiotiske forbindelse til foderet, der indtages af de pågældende dyr.

8. Biologisk ren kultur af en stamme af slægten Actinoplanes, k e n d e t e g n e t ved, at den er stammen ATCC 53533 eller en UK-68.597-producerende mutant heraf.