



**NORGE**

(19) [NO]

STYRET FOR DET  
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) Nr. 166753

(51) Int. Cl.<sup>8</sup> A 23 K 1/17

(83)

(21) Patentsøknad nr. **864673**  
(22) Inngivelsesdag 21.11.86  
(24) Løpedag 19.07.82  
(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr. **822480**  
(71)(73) Søker/Patenthaver **PFIZER INC.**,  
235 East 42nd Street,  
New York, NY 10017, US

(86) Internasjonal søknad nr. -  
(86) Internasjonal inngivelsesdag -  
(85) Videreføringsdag -  
(41) Alment tilgjengelig fra 21.01.83  
(44) Utlegningsdag 27.05.91  
(72) Oppfinner **WALTER DANIEL CELMER**, New London, CT,  
**WALTER PATRICK CULLEN**, New London, CT, US  
**RIICHIRO SHIBAKAWA**, Handa-City, Aichi-Ken,  
**JUNSUKE TONE**, Chita-City, Aichi-Ken,  
JP

(74) Fullmektig Siv.ing. Sigrun E. Græsbøll,  
Bryn & Aarflot A/S, Oslo.

(30) Prioritet begjært 20.07.81, US, nr 285264.

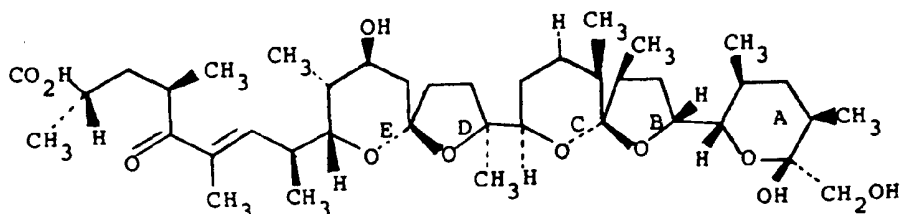
(54) Oppfinnelsens benevnelse **Vekstfremmende og fôrutnyttelses-  
effektivitetsøkende fôr for kveg og svin.**

(57) Sammendrag **Frengangsmåte for å fremme vekst av kveg og for å øke fôr-  
utnyttelseseffektiviteten derav, hvorved det til kveget admini-  
streres oralt et antibiotikum fremstilt ut fra mikroorganismen  
Streptomyces halstedii ATCC 31812 som er dyrket i vandige media  
inneholdende en assimilerbar kilde for karbon, nitrogen og  
uorganiske salter under neddykkede, aerobe fermenterings-  
betingelser, hvoretter antibiotikumet er separert fra fermen-  
teringsmediet og fermenteringsmediet er inndampet til tørrhet.**

(56) Anførte publikasjoner Ingen.

Norsk patent nr. 156.653 vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av et antibiotikum av gruppen sure polycykliske etere, en klasse av forbindelser som er karakterisert biologisk ved deres effekt på kationtransport i mitokondrier. Denne familie av anti-biotika omfatter monensin [J.Amer.Chem. Soc., 89-5737 (1967)]; nigericin [Biochem. Biophys. Res. Comm., 33; 29 (1968)]; grisorixin [J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1421 (1970)]; dianemycin [J. Antibiotics, 22: 161 (1969)]; salinomycin [J. Antibiotics, 27: 814 (1974)]; X-537A [J. Chem. Soc., Chem. Commun., 967 (1972)]; X-206 [J.Chem. Soc., Chem. Commun., 927, (1971)]; A204A [J.Amer. Chem. Soc., 95; 3399 (1973)]; mutalomycin [J. Antibiotics, 30: 903, (1977)]; ionomycin [J.Amer. Chem. Soc., 101: 3344 (1979)]; K-41B [J.Antibiotics, 32: 169 (1979)]; A-130B og A-130C [J.Antibiotics, 33: 94 (1980)]; leuseramycin [J. Antibiotics, 33: 137, 1980)]; og A-2869B [J.Antibiotics, 33: 252, 1980)]. Emnet er også gjennomgått av Westley, "Polyether Antibiotics", Adv. Appl. Microbiol., 22: 177 (1977).

Foreliggende oppfinnelse vedrører et vekstfremmende og fórutnyttelseeffektivitetsøkende fó for kveg eller svin, og fóret er karakterisert ved at det omfatter en vekstfremmende og fórutnyttelseeffektivitetsøkende mengde av et antibiotikum med følgende formel:



eller et salt derav, idet mengden er opp til 200 ppm.

166753

2

Ytelsesøkning (øket veksthastighet og/eller øket effektivitet for fôrutnyttelse) hos drøvtyggere, som f.eks. kveg, er et økonomisk ønskelig formål for veterinærvitenskapen.

Av spesiell interesse er vekstøkning oppnådd ved økning av effektiviteten for fôrutnyttelsen. Mekanismen for utnyttelse av hovednæringsdelen (karbohydrater) i drøvtyggerfôr er vel kjent. Mikroorganismer i dyrets rumen nedbryter karbohydrater til monosakkarider og omdanner så disse monosakkarider til pyruvatforbindelser. Pyruvater metaboliseres ved mikrobiologiske prosesser for å danne acetater, butyrater eller propionater, kollektivt kjent som flyktige fettsyrer (VFA). For en mer detaljert diskusjon se Leng i "Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant", Phillipson et al., utgivere Oriel Press, Newcastle-upon-Tyne, England, 1970, sidene 408-410.

Den relative effektivitet for VFA-utnyttelse er diskutert av McCullough i "Feedstuffs", 19. juni 1971, s. 19, Eskeland et al. i J.An.Sci. 33, 282 (1971) og Church et al. i "Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants", vol. 2, 1981, sidene 622 og 625. Selv om acetater og butyrater utnyttes, utnyttes propionater med større effektivitet. Når for lite propionat er tilgjengelig, kan dyrene dessuten utvikle ketose. En nyttige forbindelse stimulerer derfor dyrene til å produsere en større mengde propionater fra karbohydrater, og derved økes karbohydrat-utnyttelseeffektiviteten og tilfelle-av ketose reduseres også.

Foreliggende oppfinnelse benytter et nytt surt polycyklisk eter-antibiotikum fremstilt ved neddykket aerob dyrking i vanlige næringsmedia av *Streptomyces halstedii* ATCC 31812 isolert fra en jordprøve fra Japan. Antibiotikumet og dets kationiske salter er aktive mot en rekke mikroorganismer og er effektive for bekjempelse av kokkidiose, enteritt, svinedysenteri og theileriose såvel som at de er effektive for å fremme vekst hos fjærfe og drøvtyggere. Det henvises forøvrig til kravet.

De følgende infrarøde absorpsjonsspektra i kaliumbromid er vist på tegningene:

Fig. 1 - Antibiotikum 53 607 i natriumsaltform.

Fig. 2 - Antibiotikum 53 607 i den frie syreformen.

Antibiotisk forbindelse 53 607 oppviser inhiberende virkning mot vekst av en rekke gram-positive mikroorganismer. I tabell I nedenfor er resultatene av in vitro MIC-tester oppsummert. For denne testen inokuleres hver organisme i en serie av reagensglass inneholdende nærings-medium og forskjellige konsentrasjoner av forbindelse 53 607 for å bestemme den minimale konsentrasjon av antibiotikumet i mikrogram/milliliter som inhiberer organismen over en periode på 24 timer (MIC).

TABELL I

Organisme		MIC, mkg/ml Forbindelse 53 607 (natriumsalt)
<u>Staphylococcus aureus</u>	01A005	0,78
	01A052	0,78
	01A110	1,56
	01A400	1,56
<u>Streptococcus faecalis</u>	02A006	1,56
<u>Streptococcus pyogenes</u>	020203	<0,01
<u>Corynebacterium pyogenes</u>	11D001	25
<u>Bacillus subtilis</u>	06A001	0,39
<u>Bacteroides fragilis</u>	78C004	12,5
	78C009	6,25
	78C010	6,25
<u>Bacteroides vulgatis</u>	78E032	3,12
<u>Haemophilus influenza</u>	54A036	6,25
	54A037	3,12
	54A059	12,5
<u>Pasteurella multocida</u>	59A001	>200
<u>Clostridium perfringens</u>	10A002	0,98
	10A003	0,98
<u>Neisseria sicca</u>	66C000	25
<u>Staphylococcus epidermidis</u>	01B087R	0,78
	01B111RR	0,78
	01B126	1,56
<u>Fusobacterium necrophorum</u>	84C004	3,12
<u>Treponema hyodysenteriae</u>	94A001	0,39
	94A002	0,098

Verdien av dyrefôr har generelt blitt bestemt ved fôring av dyret. GB-patentskrift 1 197 826 beskriver i detalj en in vitro rumen-teknikk, hvorved de forandringer som opptrer i fôr forårsaket av mikroorganismer måles lettere og med større nøyaktighet ved vurderingen av dyrefôr. Denne teknikk omfatter bruken av et apparat i hvilket fordøyelsesprosessene til dyrene gjennomføres og studeres in vitro. Dyrefôrene, rumen inoculum og forskjellige vekstfremmende midler innføres i og tas ut av en laboratorieenhet under omsorgsfullt regulerte betingelser og de forandringer som finner sted studeres kritisk og progressivt under mikroorganismenes fortæring av fôret. En økning av propionsyreinnholdet i rumen-væsken indikerer at en ønskelig respons i total drøvtyggerytelse er frembragt av det vekstfremmende midlet i fôrblendingen. Forandringen i propionsyreinnhold uttrykkes som prosent av propionsyreinnholdet som finnes i kontroll-rumen-væsken. Langvarige fôringsforsøk in vivo brukes for å vise en pålitelig korrelasjon mellom propionsyreøkning i rumen-væsken og forbedret ytelse av dyrene.

Rumen-væske oppsamles fra en fistulert ku som mates med en kommersiell fetende rasjon pluss høy. Rumen-væsken filtreres straks gjennom osteduk, og 10 ml tilsettes til en 50 ml konisk kolbe inneholdende 400 mg standardsubstrat (68 % maisstivelse + 17 % cellulose + 15 % ekstrahert soyabønnemel), 10 ml av en puffer ved pH 6,8 og testforbindelsen. Kolbene gassbehandles med oksygenfri nitrogen i ca. 2 minutter, og inkuberes i et vannbad som rystes ved 39°C i ca. 16 timer. Alle tester gjennomføres tredobbelt.

Etter inkuberingen blandes 5 ml av prøven med 1 ml 25%ig metafosforsyre. Etter 10 minutter tilsettes 0,25 ml maursyre og blandingen sentrifugeres ved 1500 omdr. pr. minutt i 10 minutter. Prøvene analyseres så ved gass-væske-kromatografi ved hjelp av metoden til D.W. Kellog, J. Dairy Science, 52, 1690 (1969). Kurvetopper for eddik-, propion- og smør-syrer bestemmes for prøvene fra ubehandlede og behandlede inkuberingskolber.

Når den testes ved hjelp av denne in vitro-fremgangsmåte, forårsaket antibiotisk forbindelse 53 607 i en mengde av 20 mikrogram pr. milliliter ca, 57 % økning av produksjonen av propionsyre sammenlignet med produksjonen i kontroll-løsningen uten tilsatt antibiotisk forbindelse 53 607. Som sammenligning

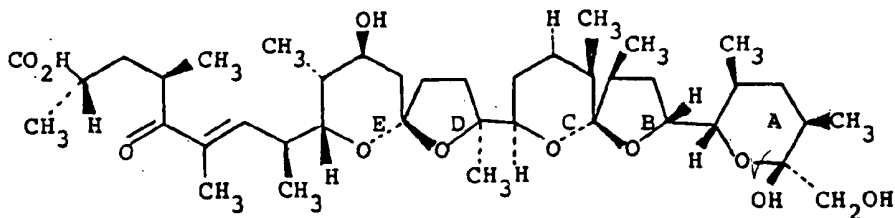
ga det kommersielt tilgjengelige Monensin (et annet polycyklisk eter-antibiotikum) i en mengde på 10 µm/ml ca. 20 % økning av propionsyre i forhold til kontrollen [J. Amer. Chem. Soc. 89, 5737 (1967)].

Når den sammenlignes med Salinomycin [J. Antibiotics, 27, 814 (1974)], produserte antibiotisk forbindelse 53 607 ca. 43 % økning av propionsyre i en mengde av 20 µg/ml og ca. 40 % ved 5 µg/ml sammenlignet med økningen på ca. 52 % for Salinomycin ved 5 µg/ml.

Basert på disse data kan det forutsies at antibiotisk forbindelse 53 607 vil forbedre fôrutnyttelsen hos drøvtyggere som f.eks. kveg og får og hos énmagete dyr som f.eks. griser og kanner. Antibiotisk forbindelse 53 607 kan innblandes i fôrblandinger som den frie syre, natriumsalter, kaliumsalter eller blandinger derav. Rå blandinger av antibiotikum 53 607 eller tørket fermenteringsvæske inneholdende antibiotikumet kan innblandes i fôrblandinger i ønskede styrkekonsentrasjoner.

#### P a t e n t k r a v

Vekstfremmende og fôrutnyttelseseffektivitetsøkende for kveg eller svin, karakterisert ved at fôret omfatter en vekstfremmende og fôrutnyttelseseffektivitetsøkende mengde av et antibiotikum med følgende formel:



eller et salt derav, idet mengden er opp til 200 ppm.