

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

228517
(11) (B2)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

(22) Přihlášeno 29 07 81

(21) (PV 5777-81)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 29 07 80
(173313 a 173312)
Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 15 09 83

(45) Vydáno 15 08 86

(51) Int. Cl.⁵
C 07 H 17/08
C 07 D 313/00
A 61 K 31/335
C 12 P 16/62

(72)

Autor vynálezu

SENO EUGENE THOMAS, NORWICH (Velká Británie), BALTZ
RICHARD HENRY, INDIANAPOLIS, INDIANA, HAMILL ROBERT L.,
GREENWOOD, INDIANA, WILD GENE MURIEL, INDIANAPOLIS,
INDIANA (Sp. st. a.)

(73)

Majitel patentu

ELI LILLY AND COMPANY, INDIANAPOLIS, INDIANA (Sp. st. a.)

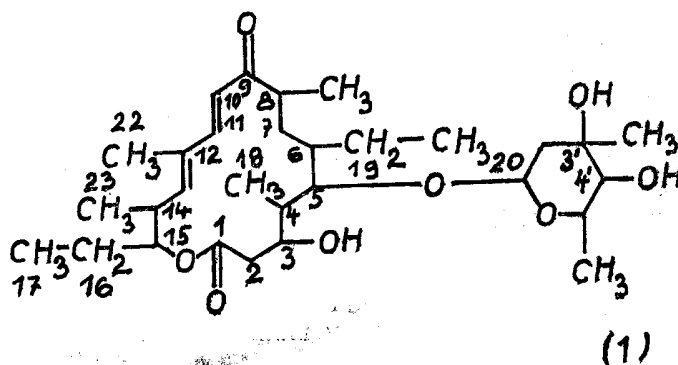
(54) Způsob výroby makrolidů

1

Vynález se týká způsobu výroby makrolidů a příbuzných derivátů, z nichž je možno vyrobit cenná antibiotika, například tylosin, který byl popsán v publikaci Tetrahedron Letters, 2339 (1970).

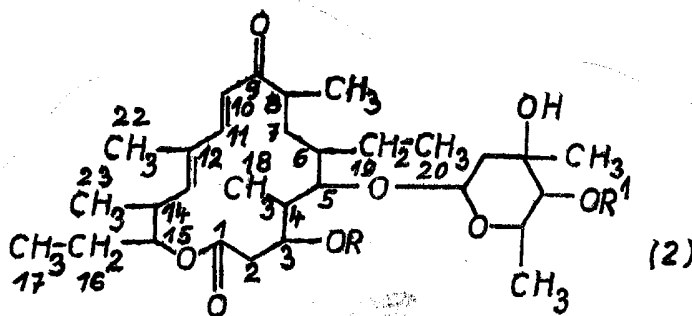
2

Nová sloučenina 5-O-mykarosyl-20-dihydro-20,23-didesoxytylonolid bude dále nazývána mykarosyltylakton. Tuto látku je možno vyjádřit vzorcem 1



Přestože v této struktuře není uvedena stereochemická konfigurace, je tato stejná jako v případě odpovídající části tylosinu. Cukr ve vzorci 1 je mykaróza.

Příbuzné mykarosyltylaktonové deriváty je možno vyjádřit obecným vzorcem 2

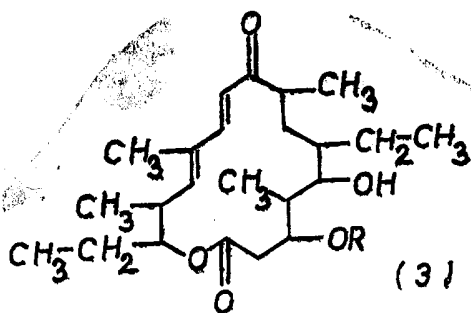


kde

E a R¹ znamenají acylové skupiny.

Vynález se dále týká způsobu výroby 3-O-acyltylaktonových derivátů, které je možno připravit z mykarosyltylaktonových derivátů obecného vzorce 2. Je tedy možno získat tylakton nebo 3-O-acyltylaktonové deriváty hydrolýzou mykarosyltylaktonu nebo mykarosyltylaktonových derivátů obecného vzorce 2 z mírně kyselého prostředí.

3-O-acyltylaktonové deriváty je možno vyjádřit obecným vzorcem 3

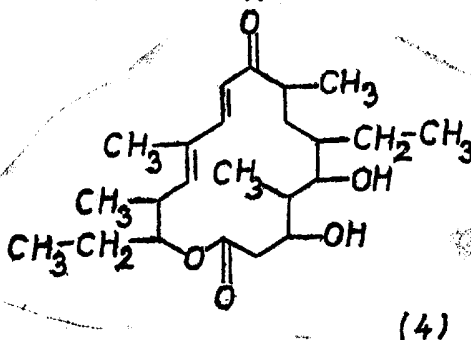


kde

R znamená acylovou skupinu.

Sloučeniny vzorců 1, 2 a 3 jsou cennými meziprodukty, z nichž je možno připravit makrolidová antibiotika s 16člennou strukturou. Způsobem podle vynálezu je možno chemicky získat deriváty sloučeniny vzorce 3 za vzniku odpovídajících 3-monoacylovaných makrolidových antibiotik s 16člennou strukturou.

Mykarosyltylakton je velmi důležitou sloučeninou, protože je meziproduktem pro výrobu tylaktonu a tylaktonových derivátů. Tylakton je možno vyjádřit vzorcem 4



Mykarosyltylakton je možno oddělit od tylaktonu a tylosinu chromatografií na tenké vrstvě silikagelu; k detekci je možno použít postřík kyselinou sírovou, a to koncentrovanou nebo zředěnou na 50 %. Při detekci tímto způsobem se zpočátku jeví tylakton jako žlutohnědá skvrna a mykarosyltylakton jako modročervená skvrna. V případě, že se ke chromatografii užije silikagelová plotna s fluorescenčním pozadím, provádí se detekce ultrafialovým světlem. Přibližné hodnoty R_f pro mykarosyltylakton jsou uvedeny v tabulce 1.

TABULKA 1

Chromatografie mykarosyltylaktonu na tenké vrstvě^a

Sloučenina	Hodnoty R _f	
	A ^b	B
mykarosyltylakton	0,17	0,44
tylakton	0,50	0,62
tylosin	0,0	0,0

^aProstředí: silikagel

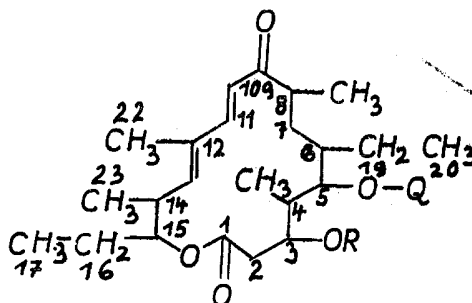
^bRozpouštědlo:

A = směs benzenu a ethylacetátu v poměru 4 : 1

B = směs benzenu a ethylacetátu v poměru 3 : 2.

Mykarosyltylakton je možno získat pěstováním kmene *Streptomyces fradiae*, který tuto sloučeninu produkuje v submerzní kultuře za aerobních podmínek ve vhodném živném prostředí do nahromadění antibiotika.

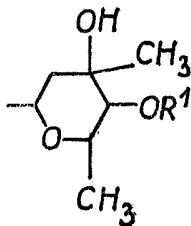
Předmětem vynálezu je tedy způsob výroby makrolidů obecného vzorce I



kde

R znamená atom vodíku nebo acylovou skupinu o 1 až 18 atomech uhlíku,

Q znamená atom vodíku nebo mykarosylovou skupinu vzorce



kde

R¹ znamená atom vodíku nebo acylovou skupinu o 1 až 18 atomech uhlíku, za předpokladu, že v případě, že Q znamená atom vodíku, znamená R acylovou skupinu, vyznačující se tím, že se pěstuje kmen *Streptomyces fradiae* NRRL 12 201 v submerzní kultuře za aerobních podmínek v živném prostředí, obsahujícím využitelné zdroje uhlíku, dusíku a anorganických solí za vzniku sloučeniny obecného vzorce I, v němž R znamená atom vodíku a Q znamená mykarosylovou skupinu, v níž R¹ znamená atom vodíku, načež se popřípadě

a) acyluje výsledný produkt za vzniku sloučeniny obecného vzorce I, v níž jeden nebo oba substituenty R a Q znamenají acylovou skupinu,

b) provede mírná hydrolýza sloučeniny obecného vzorce I, získaná ad a) za vzniku makrolidu obecného vzorce I, v němž Q znamená atom vodíku a R znamená acylovou skupinu.

Živné prostředí užitá k pěstování *Streptomyces fradiae* je možno volit z velkého počtu živných prostředí. Pro hospodárnost výroby, optimální výtěžek a snadnou izolaci produktu jsou však výhodnější některá živná prostředí. Výhodnými zdroji uhlíku pro fermentaci ve větším měřítku jsou například uhlohydráty jako dextrin, glukóza, škrob, kukuřičná mouka a oleje jako sójový olej. Výhodnými zdroji dusíku jsou kukuřičná mouka, sójová mouka, rybní mouka, aminokyseliny a podobně. Z anorganických solí, které je možno včlenit do živného prostředí jde zejména o běžné rozpustné soli, které obsahují železo, draslík, sodík, hořčík, vápník, amonný ion, chloridový ion, ion uhličitanový, síranový, dusičnanový a podobně.

Živné prostředí by také mělo obsahovat základní stopové prvky, které jsou nutné pro růst a vývoj produkčního organismu. Tyto stopové prvky se však běžně vyskytují jako nečistoty v dalších složkách živného prostředí v množství, které je dostatečné pro růstové požadavky mikroorganismu. V některých případech však může být nutné přidat malé množství, obvykle 0,2 ml/l proti-pěněního činidla, například polypropylen-

glykolu s molekulovou hmotností přibližně 2000, a to zejména při fermentaci ve velkém měřítku, kde pění je velkým problémem.

Pro produkci většího množství mykarosyltylaktonu je výhodná suberzní kultura za aerobních podmínek v tanku. Malé množství mykarosyltylaktonu je možno získat také v třepacích lahvích. Protože při očkování velkých tanků sporami mikroorganismu je nutno vyčkat přes období lag, je výhodné užít vegetativního očkovacího materiálu. Vegetativní očkovací materiál se získá tak, že se malý objem živného prostředí naočkuje sporami nebo fragmenty mycelia mikroorganismu, čímž se získá čerstvá, aktivně rostoucí kultura. Tento vegetativní očkovací materiál se pak užije k naočkování většího tanku. Živné prostředí, užitá k získání očkovacího materiálu může být totéž prostředí, jakého se používá při fermentaci ve větším měřítku, je však možno užít i jiného prostředí.

Mikroorganismus, který se užívá při provádění způsobu podle vynálezu, byl získán chemickou mutagenézou kmene *Streptomyces fradiae*, který produkuje tylosin. Takto získaný mikroorganismus produkuje pouze velmi malé množství tylosinu, avšak jako hlavní složky produkuje mykarosyltylakton a tylakton.

Nový mikroorganismus, který produkuje mykarosyltylakton, je možno klasifikovat jako kmen *Streptomyces fradiae*. Kultura tohoto mikroorganismu byla uložena do sbírky Northern Regional Research Center, Agricultural Research, North Central Region, 1815 North University Street, Peoria, Illinois, 61604, odkud je možno ji získat pod číslem NRRL 12 201.

Tak jak je tomu u ostatních mikroorganismů, mohou se vlastnosti kmene *Streptomyces fradiae* NRRL 12 201 poněkud měnit. Z kmene NRRL 12 201 je možno známým způsobem získat rekombinanty, mutanty nebo varianty. Mutanty je například možno získat působením známých fyzikálních a chemických mutagenů, například ultrafialového světla, paprsků X, paprsků γ a N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidinu. Všechny přírodní a uměle vyvolané varianty, mutanty a rekombinanty kmene *Streptomyces fradiae* NRRL 12 201 je možno užít při provádění způsobu podle vynálezu, pokud si uchovávají schopnost produkovat mykarosyltylakton.

Kmen *S. fradiae* NRRL 12 201 je možno pěstovat při teplotách 10 až 40 °C. K optimální produkci mykarosyltylaktonu dochází při teplotě přibližně 28 °C.

Při provádění submerzní kultivace za aerobních podmínek se živným prostředím nechá probublávat sterilní vzduch. Pro účinnou produkci antibiotika má být nasycení živného prostředí vzduchem přibližně 30 % nebo vyšší při teplotě 28 °C a atmosférickém tlaku.

Produkci mykarosyltylaktonu a tylaktonu je v průběhu fermentace možno sledovat odebráním vzorků živného prostředí a tyto vzorky se pak analyzují chromatograficky na tenké vrstvě nebo vysokotlakou kapalinovou chromatografií, detekce se provádí ultrafialovým světlem.

Po skončení fermentace v submerzní kultuře za aerobních podmínek je možno izolovat mykarosyltylakton z fermentačního prostředí běžnými způsoby. Protože rozpustnost mykarosyltylaktonu ve vodě je velmi omezená, není tento makrolid téměř vůbec rozpustěn v živném prostředí. Izolaci mykarosyltylaktonu je tedy možno provádět:

1. extrakcí fermentačního prostředí nebo
2. filtrací fermentačního prostředí a extrakcí zfiltrovaného prostředí i myceliálního koláče.

K extrakci je možno použít různých způsobů. Výhodným způsobem čištění zfiltrovaného živného prostředí je extrakce tohoto prostředí vhodným rozpouštědlem, a to obvykle bez úpravy pH. Vhodným rozpouštědlem je například aminoacetát nebo petrolether. Pak se organická fáze odpaří ve vakuu, čímž se získá krystalická látka nebo olejovitá kapalina. Tato krystalická látka nebo olejovitá kapalina se pak popřípadě čistí adsorpční chromatografií, čímž se získá mykarosyltylakton a tylakton.

Mykarosyltylakton je možno esterifikovat na hydroxylových skupinách v poloze 3 a 4' za vzniku acylesterových derivátů obecného vzorce 2 působením acylačních činidel známým způsobem. Acylesterové deriváty mykarosyltylaktonu jsou cennými meziprodukty při výrobě nových makrolidových antibiotik.

Typickými acylačními činidly jsou anhydridy, halogenidy, obvykle v kombinaci se zásadou nebo jinou látkou, která pohlcuje kyselinu a také aktivní estery organických kyselin. Acylaci je také možno provádět působením směsi organické kyseliny a dehydratačního činidla, například N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu.

Uvedené deriváty je možno získat esterifikací, tak jak se běžně provádí, například tak, že se na uvedenou látku působí stochiometrickým množstvím nebo malým přebytkem acylačního činidla, například anhydridu kyseliny v organickém rozpouštědle, například pyridinu při teplotě 0 °C až teplotě místnosti po dobu 1 až 24 hodin nebo až do úplného ukončení esterifikace. Esterové deriváty je možno izolovat z reakční směsi běžným způsobem, například extrakcí, chromatografií a krystalizací.

Použitelnými estery jsou estery organických kyselin, a to kyselin alifatických, cykloalifatických, arylkarboxylových, aralkylkarboxylových, heterocyklických karboxylových kyselin a kyselin sulfonových a alkoxykarbonylových o 1 až 18 atomech uhlíku, jakož i anorganických kyselin, například kyseliny sírové nebo fosforečné.

Výhodnými estery jsou ty sloučeniny, v nichž R znamená acylovou skupinu, odvozenou od monokarboxylové nebo dikarboxylové kyseliny o 1 až 18 atomech uhlíku.

Jako příklad vhodných esterů je možno uvést estery, odvozené od organických kyselin, jako jsou kyselina mravenčí, octová, chloroctová, propionová, máselná, isovalerová, glukuronová, alkoxykarboxylová, stearová, cyklopropankarboxylová, cyklohexankarboxylová, β-cyklohexylpropionová, 1-adamantankarboxylová, benzoová, fenylacetová, fenoxycetová, mandlová a 2-thienylacetová, jakož i kyseliny alkylsulfonové, arylsulfonové a aralkylsulfonové, přičemž kyseliny, obsahující aryllovou nebo aralkylovou skupinu jsou popřípadě dále substituovány substituenty ze skupiny atom halogenu, nitro skupiny, nižší alkoxy skupiny a podobně na aromatickém jádře. Vhodnými estery jsou rovněž hemiestery, odvozené od dikarboxylových kyselin, například kyseliny jantarové, maleinové, fumarové, malonové a ftalové.

Sloučeniny vzorců 1, 2 a 3 jsou cennými produkty, z nichž je možno připravit makrolidová antibiotika s 16člennou strukturou. Je například možno hydrolyzovat mykarosyltylakton vzorce 1 na tylakton vzorce 4 v mírně kyselém prostředí. Obdobným způsobem je možno hydrolyzovat mykarosyltylaktonové deriváty obecného vzorce 2 na odpovídající 3-O-acyltylaktonové deriváty obecného vzorce 3.

Hydrolýza za mírně kyselých podmínek je známa. K provádění hydrolýzy je možno užít roztoku o pH 4 nebo nižším. Je také možno užít polárních organických pomocných rozpouštědel, jako jsou alkoholy, například ethanol k udržení reakčních složek v roztoku. Při provádění hydrolýzy je možno užít teploty 20 až 100 °C. Reakční doba, nutná k dokončení hydrolýzy závisí na pH reakční směsi a na použité teplotě. Při vyšší hodnotě pH je reakční rychlost pomalejší a při vyšší teplotě se reakční rychlost zrychluje. Reakce se provádí tak, že se na mykarosyltylakton nebo 3-O-acylmykarosyltylaktonový derivát působí mírně kyselým roztokem po dobu, dostatečnou k odstranění mykarosylové skupiny, čímž se získá tylakton nebo 3-O-acyltylakton.

Tylakton je možno biologicky přeměnit na tylosin nebo sloučeniny, příbuzné tylosinu. Biologická přeměna se provádí tak, že se tylakton přidá k rostoucí kultuře mikroorganismu, který je schopen tuto přeměnu provádět. Tímto mikroorganismem může být například kmen *Streptomyces*, který buď sám produkuje tylosin nebo je schopen produkovat tylosin, avšak produkce tylosinu je blokována.

Kmen, který je schopen produkovat tylosin, avšak produkce tylaktonu je blokována, je možno získat tak, že se na kmen, produkující tylosin působí mutagenem a přeží-

vající kmeny se pěstují, přičemž se vyhledávají kmeny, neschopné produkce tylosinu. Tyto kmeny se dále sledují a vybírají se kmeny, které neprodukují tylakton, ale jsou stále schopné biologicky převádět tylakton nebo tylosin. Tyto kmeny se identifikují tak, že se do malých třepacích lahví s obsahem kultury přidá tylakton a stanoví se, zda dochází k přeměně této látky na tylosin.

Příkladem kmenů, které jsou schopné produkovat tylosin, mohou být kmeny *Streptomyces fradiae* NRRL 2702 a NRRL 2703. Typickým mutagenem, kterého je možno použít k získání svrchu uvedených kmenů je N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin.

Tylakton a 3-O-acyltylaktonové deriváty jsou velmi cennými látkami při výrobě značených sloučenin pro biosyntetické nebo metabolické pokusy. Při značení tylaktonové části nebo cukru je možno získat specificky značený tylosin, který je cenný pro biosyntetické nebo metabolické zkoušky. Acylová skupina 3-O-acyltylaktonových derivátů je dalším místem, na kterém je možno tyto deriváty značit.

Vynález bude osvětlen následujícími příklady.

Příklad 1

A. Fermentace mykarosyltylaktonu v třepacích lahvích

Lyofilizovaná peleta *Streptomyces fradiae* NRRL 12 201 se disperguje v 1 až 2 ml sterilizované vody. 0,5 ml takto získaného roztoku se použije k naočkování 150 ml vegetativního živného prostředí následujícího složení:

Složka	Množství v %
kukuřičný výluh	1,0
extrakt z kvasnic	0,5
drť ze sójových bobů	0,5
uhličitan vápenatý	0,3
surový sójový olej	0,45
deionizovaná voda	97,25

Je také možno postupovat tak, že se vegetativní kultura *S. fradiae* NRRL 12 201, uchovávaná po objemu 1 ml v kapalném dusíku rychle rozmrazí a použije k naočkování vegetativního živného prostředí. Naočkované vegetativní živné prostředí se pak inkubuje v Erlenmeyerových baňkách o objemu 500 ml při teplotě 29 °C po dobu 48 hodin v uzavřené třepačce při 300 výkyvech za minutu.

0,5 ml takto inkubovaného vegetativního živného prostředí se pak použije k naočkování 7 ml produkčního živného prostředí následujícího složení:

Složka	Množství v %
řepná melasa	2,0
kukuřičná mouka	1,5
rybí mouka	0,9
kukuřičný gluten	0,9
chlorid sodný	0,1
hydrogenfosforečnan amonný	0,04
uhličitan vápenatý	0,2
surový sójový olej	3,0
deionizovaná voda	91,36

Naočkované fermentační prostředí se inkubuje v baňce o obsahu 50 ml při teplotě 29 °C přibližně 6 dní v uzavřené třepačce při 300 výkyvech za minutu.

B. Fermentace mykarosyltylaktonu v tanku

Aby bylo možno získat větší množství očkovacího materiálu, užije se 60 ml vegetativní kultury, připravené obdobným způsobem jako v odstavci A k naočkování 38 litrů vegetativního živného prostředí druhého stupně následujícího složení:

Složka	Množství v %
kukuřičný výluh	1,0
sójová mouka	0,5
extrakt z kvasnic	0,5
uhličitan vápenatý	0,3
surový sójový olej	0,5
surový lecithin	0,015
voda	97,185

Živné prostředí se upraví na pH 8,5 přidáním 50% roztoku hydroxidu sodného.

Toto vegetativní živné prostředí druhého stupně se po naočkování inkubuje v tanku o obsahu 68 litrů 47 hodin při teplotě 29 °C.

4 litry takto získané kultury se použije k naočkování 40 litrů sterilního produkčního živného prostředí následujícího složení:

Složka	Množství v %
rybí mouka	0,92
kukuřičná mouka	1,57
kukuřičný gluten	0,92
uhličitan vápenatý	0,21
chlorid sodný	0,10
hydrogenfosforečnan amonný	0,04
řepná melasa	2,10
surový sójový olej	3,15
lecithin	0,09
voda	90,90

Živné prostředí se upraví na pH 7,2 přidáním 50% roztoku hydroxidu sodného.

Naočkované produkční prostředí se fermentuje v tanku o objemu 68 litrů přibliž-

ně 5 dnů při teplotě 28 °C. Fermentační prostředí se provzdušňuje sterilním vzduchem tak, aby nasycení kyslíkem bylo 30 až 50 % a současně se míchá běžnými míchadly při 300 otáčkách za minutu.

Příklad 2

Izolace mykarosyltylaktonu a tylaktonu

900 ml fermentačního prostředí, získaného způsobem podle příkladu 1 odstavec A se extrahuje 900 ml petroletheru. Petroletherový extrakt se zahustí v proudu vzduchu na olejovitou kapalinu. Tato olejovitá kapalina se rozpustí v malém množství ethylacetátu (přibližně 15 ml). Pak se přidá přibližně 15 až 20 ml heptanu. Ethylacetát se nechá pomalu odpařit, čímž dojde ke krystalizaci. Krystaly se oddělí, čímž se získá 450 mg krystalické směsi tylaktonu a mykarosyltylaktonu.

Další materiál je možno získat tak, že se ke zbývajcímu živnému prostředí přidá stejný objem methanolu, výsledný roztok se zfiltruje a filtrát se extrahuje methylenchloridem.

400 mg krystalické směsi se rozpustí v benzenu. Benzenový roztok se chromatografuje na sloupci silikagelu (Woelm) v benzenu. Eluce se sleduje chromatografií na tenké vrstvě silikagelu při použití směsi benzenu a ethylacetátu v poměru 3 : 2 jako rozpouštědla a koncentrované kyseliny sírové k detekci. Sloupec se nejprve vymývá benzenem k odstranění tukovitých látek, pak 1 litrem směsi benzenu a ethylacetátu v poměru 9 : 1, 1400 ml směsi benzenu a ethylacetátu v poměru 6 : 1 a 900 ml směsi benzenu a ethylacetátu v poměru 3 : 1, čímž se oddělí a izoluje tylakton a mykarosyltylakton. Odebírají se frakce o objemu 150 mililitrů. Nejprve se ve frakcích 14 až 19 vymyje tylakton, později ve frakcích 22 až 26 mykarosyltylakton. Frakce s obsahem každé látky se slijí, odpaří se ve vakuu a odparek se nechá krystalizovat z heptanu, čímž se získá 160 mg tylaktonu a 120 mg mykarosyltylaktonu.

Mykarosyltylakton je bílá pevná látka, která krystalizuje z heptanu, hexanu nebo směsi ethylacetátu a hexanu a má teplotu tání 182 až 184 °C. Má následující přibližné procentuální složení:

uhlík 67 %, vodík 9 % a kyslík 24 %.

Empirický vzorec této látky je $C_{30}H_{50}O_8$, molekulová hmotnost je přibližně 538.

Na přiloženém výkresu je uvedeno spektrum mykarosyltylaktonu v chloroformu v infračerveném světle. Pozorovatelná absorpční maxima jsou při následujících frekvencích (cm^{-1}): 3640 (střední), 2941 a 2907 (dublet silný), 2421 (velmi malé), 1712 (silné), 1678 (střední), 1623 (malé), 1590 (silné), 1456 (střední), 1404 (malé), 1374 (ma-

lé), 1359 (hrb), 1314 (malé), 1284 (malé), 1263 (velmi malé), 1229 (malé), 1178 (silné), 1157 (střední), 1134 (velmi malé), 1109 (malé), 1078 (velmi malé), 1050 (střední), 1025 (velmi malé), 1000 (silné), 984 (silné), 962 (střední), 920 (velmi malé), 911 (velmi malé), 889 (malé), 867 (malé), 848 (hrb), 836 (malé) a 799 (malé).

Absorpční spektrum mykarosyltylaktonu v ultrafialovém světle v neutrálním ethanolu má absorpční maximum při 282 nm ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 568$).

Mykarosyltylakton má následující specifickou otáčivost: $[\alpha]_D^{25} -46,4^\circ$ ($c = 1$, CH_3OH).

Mykarosyltylakton je téměř nerozpustný ve vodě, je však rozpustný v organických rozpouštědlech, například acetonu, methanolu, ethanolu, dimethylformamidu, chloroformu, diethyletheru, petroletheru, benzenu a dimethylsulfoxidu.

Příklad 3

3,4'-di-O-acetyl-5-O-mykarosyltylakton

20 mg mykarosyltylaktonu, připraveného způsobem podle příkladu 2 se rozpustí v 0,5 ml pyridinu. Přidá se 0,25 ml anhydridu kyseliny octové. Výsledná směs se míchá 15 hodin při teplotě místnosti a pak se odpaří dosucha ve vakuu. Odparek se znovu rozpustí ve směsi methanolu a cyklohexanu a znovu se odpaří, čímž se získá jako pevná látka 3,4'-di-O-acetyl-5-O-mykarosyltylakton.

Příklad 4

3,4'-di-O-propionyl-5-O-mykarosyltylakton je možno získat obdobným způsobem jako v příkladu 3, s tím rozdílem, že se použije anhydrid kyseliny propionové.

Příklad 5

3,4'-di-O-isovalery-5-O-mykarosyltylakton je možno získat obdobným způsobem jako v příkladu 3, s tím rozdílem, že se použije anhydrid kyseliny isovalerové.

Příklad 6

3,4'-di-O-benzoyl-5-O-mykarosyltylakton je možno získat obdobným způsobem jako v příkladu 3 s tím rozdílem, že se použije anhydrid kyseliny benzoové.

Příklad 7

3,4'-di-O-(n-butyryl)-5-O-mykarosyltylakton je možno získat obdobným způsobem jako v příkladu 3 s tím rozdílem, že se použije anhydrid kyseliny n-másečné.

Příklad 8

Příprava tylaktonu z mykarosyltylaktonu

Mykarosyltylakton, připravený způsobem podle příkladu 2 se rozpustí ve směsi methanolu a vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové o pH 1,8. Výsledný roztok se nechá stát do ukončení hydrolýzy, přičemž se 30 minut zahřeje na parní lázni a pak se upraví na pH 7,0 přidáním hydroxidu sodného. Vzniklý roztok se extrahuje ethylacetátem, dichlormethanem nebo chloroformem. Extrakt se vysuší a odpaří ve vakuu, čímž se získá tylakton.

Tylakton je bílá pevná látka, která krystalizuje z heptanu, hexanu nebo ze směsi ethylacetátu a hexanu a má teplotu tání 162 až 163 °C. Tylakton má následující přibližné procentální složení:

uhlík 70 %, vodík 9,7 %, kyslík 20,3 %.

Empirický vzorec je $C_{23}H_{38}O_5$, molekulová hmotnost je přibližně 394.

Absorpční spektrum tylaktonu v infračerveném světle v chloroformu má absorpční maxima při následujících frekvencích (cm^{-1}): 3534 (střední), 2924 (silné), 2398 (slabé), 2353 (slabé), 1709 (velmi silné), 1678 (velmi silné), 1626 (malé), 1592 (velmi silné), 1458 (silné), 1441 (hrb), 1404 (silné), 1379 (malé), 1316 (silné), 1284 (střední), 1181 (velmi silné), 1143 (silné), 1103 (střední), 1078 (střední), 1049 (velmi malé), 1025 (střední), 984 (velmi silné), 958 (silné), 923 (střední), 911 (hrb), 859 (malé), 868 (střední), 840 (střední), 820 (velmi malé) a 661 (malé).

Absorpční spektrum tylaktonu v ultrafialovém světle v neutrálním ethanolu má absorpční maximum při 282 nm ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 560$).

Tylakton má následující specifickou otáčivost:

$[\alpha]_D^{25} = -55,23^\circ$ ($c = 1$, CH_3OH).

Elektrometrickou titrací tylaktonu v 66% vodném roztoku dimethylformamidu je možno prokázat, že tato sloučenina neobsahuje žádné titrovatelné skupiny.

Tylakton je téměř nerozpustný ve vodě, avšak je rozpustný v organických rozpouštědlech, například acetonu, methanolu, ethanolu, dimethylformamidu, chloroformu, diethyletheru, petroletheru, benzenu a dimethylsulfoxidu.

Příklad 9

Příprava 3-O-acetyltylaktonu

3,4'-di-O-acetyl-5-O-mykarosyltylakton, připravený způsobem podle příkladu 3 se hydrolizuje obdobným způsobem jako v příkladu 8 při použití směsi methanolu a kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,1 N v poměru 1:1 při pH 1,5, čímž se získá 3-O-acetyltylakton.

Příklad 10

3-O-propionyltylakton je možno získat z

3,4'-di-O-propionyl-5-O-mykarosyltylaktonu, získaného podle příkladu 4 způsobem podle příkladu 9.

Příklad 11

3-O-isovaleryltylakton je možno získat z 3,4'-di-O-isovaleryl-5-O-mykarosyltylaktonu, připraveného způsobem podle příkladu 5 obdobným způsobem jako v příkladu 9.

Příklad 12

3-O-benzoyltylakton je možno získat z 3,4'-di-O-benzoyl-5-O-mykarosyltylaktonu, připraveného způsobem podle příkladu 6 obdobným způsobem jako v příkladu 9.

Příklad 13

3-O-(n-butyryl)tylakton je možno získat z 3,4'-di-O-(n-butyryl)-5-O-mykarosyltylaktonu, připraveného způsobem podle příkladu 7 obdobným způsobem jako v příkladu 9.

Příklad 14

Příprava tylosinu z tylaktonu

Kmen *Streptomyces fradiae*, který dříve produkoval tylosin, avšak byl blokován, pokud jde o uzavření makrolidového kruhu, se pěstuje způsobem, popsaným v příkladu 1, odstavec A. Kmen se pěstuje při teplotě 28 °C. Po 48 hodinách od začátku fermentace se přidá tylakton. Pak se fermentace provádí tak dlouho, až se nahromadí dostatečné množství tylosinu, to je přibližně další 3 dny. Přítomnost tylosinu je možno prokázat tak, že se odebírají vzorky živného prostředí a tyto vzorky se pěstují proti mikroorganismům, které jsou citlivé na tylosin. Jedním z použitelných organismů je *Staphylococcus aureus* ATCC 9144. Biologickou zkoušku je možno snadno provést automaticky turbidimetrickou metodou. Je také možno použít chromatografie na tenké vrstvě nebo vysokotlaké kapalinové chromatografie, k detekci se použije ultrafialového světla.

Příklad 15

Příprava značeného tylosinu

Mykarosyltylakton se připraví způsobem, uvedeným v příkladech 1 a 2 s tím rozdílem, že se do fermentačního prostředí přidá značený octan, propionát nebo butyrát. Tímto způsobem se získá značený mykarosyltylakton, který je možno použít k výrobě tylaktonu způsobem, uvedeným v příkladu 8. Tento značený tylakton se pak použije k výrobě tylosinu způsobem, který byl popsán v příkladu 14. Tímto způsobem se získá tylosin, který je značený na makrolidovém kruhu.

Příklad 16

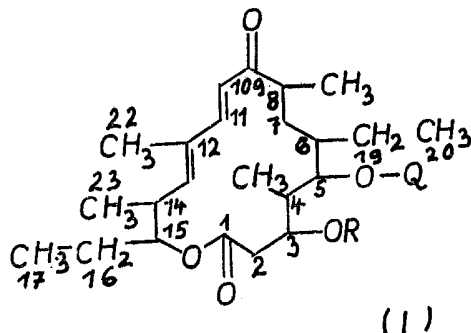
Příprava 3-O-acetyl-5-O- β -desosaminyl-
tylaktonu

3-O-acetyltylakton, připravený způsobem podle příkladu 10, se smísí s 5 ekvivalenty 1- α -brom-2-O-acetyldesosaminhydrobromidu za přítomnosti kyanidu rtuťnatého v nitro-

methanu. Reakce se provádí 10 hodin při teplotě 20 °C. 3,2'-O-diacetyl-5-O- β -desosaminyltylaktonu se izoluje sloupcovou chromatografií na silikagelu. 2'-acetylová skupina se odstraní stáním této sloučeniny v methanolu při teplotě místnosti, čímž se získá 3-O-acetyl-5-O- β -desosaminyltylakton (3-O-acetylderivát antibiotika M-4365 G₁).

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby makrolidů obecného vzorce I



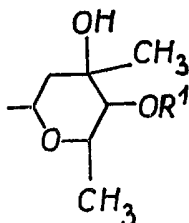
kde

R znamená atom vodíku nebo acylovou skupinu o 1 až 18 atomech uhlíku,

Q znamená atom vodíku nebo mykarosylovou skupinu vzorce

kde

R¹ znamená atom vodíku nebo acylovou skupinu o 1 až 18 atomech uhlíku, za předpokladu, že v případě, že Q znamená atom vodíku, znamená R acylovou skupinu, vyznačující se tím, že se pěstuje kmen *Streptomyces fradiae* NRRL 12201 v submerzní kultuře za aerobních podmínek v živném prostředí, obsahujícím využitelné zdroje uhlíku, dusíku, a anorganických solí za vzniku sloučeniny obecného vzorce I, v němž R znamená atom vodíku a Q znamená mykarosylovou skupinu, v níž R¹ znamená atom vodíku, načež se popřípadě acyluje výsledný produkt za vzniku sloučeniny obecného vzorce I, v níž jeden nebo oba substituenty R a Q znamenají acylovou skupinu, nebo se provede mírná hydrolýza sloučeniny obecného vzorce I, v němž Q znamená atom vodíku a R znamená acylovou skupinu.



228517

