



Ausschliessungspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11) **1596 44**

Int.Cl.³

3(51) **C 12 P 17/08**

C 12 R 1/59

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 P/ 2307 614
(31) 156854

(22) 12.06.81
(32) 12.06.80

(44) 23.03.83
(33) US

(71) siehe (73)
(72) BALTZ, RICHARD H.; WILD, GENE M.; SENO, EUGENE T.; KIRST, HERBERT; US;
(73) ELI LILLY AND CO, INDIANAPOLIS; US;
(74) (PAB) PATENTANWALTSBUERO BERLIN, 1130 BERLIN, FRANKFURTER ALLEE 286

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON MAKROLIDEN

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines neuen und antibiotisch wirksamen Makrolids mit der Bezeichnung 23-Demycinosyltylosin (DMT) und 20-Dihydro-23-demycinosyltylosin, entsprechender Acylester hiervon sowie Säureadditionssalzen hiervon durch Züchtung von *Streptomyces fradiae* NRRL 12170 unter submersen aeroben Fermentationsbedingungen unter Bildung des gewünschten Makrolids oder Reduktion von 23-Demycinosyltylosin unter Bildung von 20-Dihydro-23-demycinosyltylosin oder Bildung von Salzen oder Estern durch entsprechende Ansäuerung oder Veresterung. Die hierdurch erhaltenen Makrolide stellen wertvolle Antibiotika dar, und sie ähneln in ihrem Wirkungsspektrum dem als Therapeutikum bekannten Tylosin. Sie eignen sich daher in erster Linie zur Behandlung grampositiver Mikroorganismen sowie von Arten von *Mycoplasma*.

230761 4

- 1 -

Aktenzeichen:

X-5216

Vertreter:

Patentanwaltsbüro Berlin

Titel der Erfindung:

Verfahren zur Herstellung von Makroliden

Anwendungsgebiet der Erfindung:

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Makroliden, die wertvolle Arzneimittel sind und sich vor allem durch eine besonders interessante antibiotische Wirksamkeit auszeichnen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen:

Die vorliegenden Makrolide ähneln in ihrer Struktur dem als therapeutisches Mittel bekannten Tylosin, das beispielsweise in Tetrahedron Letters, 2339 (1970) beschrieben wird. Tylosin stellt ein sehr bedeutendes Antibiotikum dar. Unab-

12. JUN. 1981 * 940572

hängig davon besteht jedoch stets die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer Antibiotika, und zwar unter anderem allein schon infolge der Möglichkeit der Entwicklung resistenter Stämme im Laufe der Zeit. Weiter können auch entsprechende strukturelle Abwandlungen zu Veränderungen im Spektrum susceptibler Mikroorganismen führen. Eine chemische Abwandlung der Struktur tylosinähnlicher Makrolide hat sich nun leider jedoch als äußerst schwierig erwiesen. In J. Org. Chem. 44 (12), 2050 bis 2052 (1979) werden beispielsweise die Probleme angesprochen, die bei der Spaltung der Mycinosylglycosidbindung von Tylosin durch chemische Mittel auftreten. Das Hauptaugenmerk der entsprechenden Forschungsarbeiten mit dem Ziel der Schaffung und Untersuchung neuer Strukturen ist daher auf neue, in der Natur vorkommende oder synthetische Mikroorganismen mit der Hoffnung gerichtet, daß sich durch deren Züchtung mit Tylosin verwandte und wirkungsmäßig interessante Strukturen ergeben.

Aufgabe der Erfindung:

Infolge der interessanten Wirksamkeit von Tylosin und des oben angesprochenen ständigen Bedarfs an neuen Antibiotika infolge der im Laufe der Zeit sich ergebenden Resistenzbildung hat sich die Erfindung nun die Aufgabe gestellt, antibiotisch wirksame und tylosinähnliche Makrolide zu schaffen, die sich durch eine besonders interessante pharmakologische Wirksamkeit, und insbesondere eine wertvolle antibiotische Wirksamkeit auszeichnen.

Darlegung des Wesens der Erfindung:

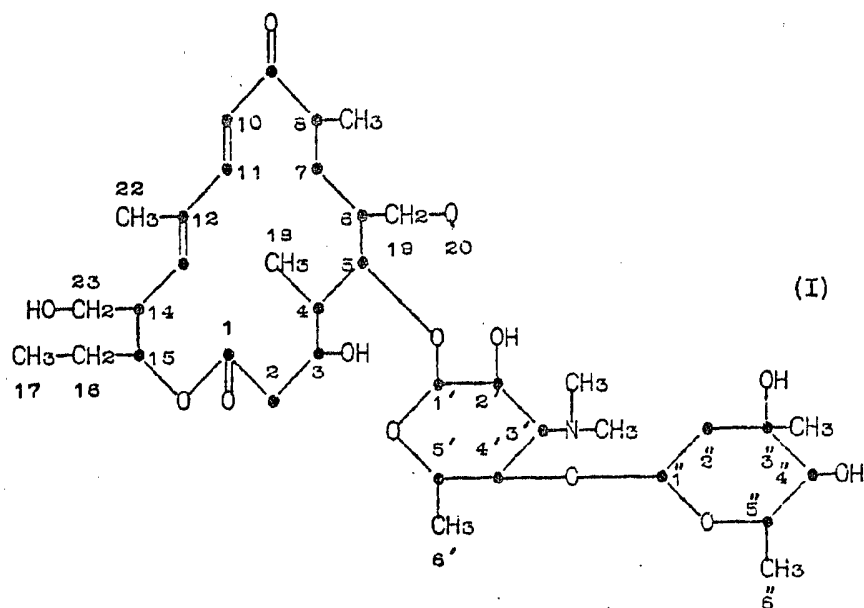
Die obige Aufgabe wird erfindungsgemäß nun gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung antibiotisch wirksamer Makrolide, die dem Tylosin ähnlich sind, dessen Mycinosylbaustein jedoch nicht enthalten, und die sich durch submerse aerobe

230761 4

- 3 -

Fermentation bestimmter Stämme von *Streptomyces fradiae* herstellen lassen.

Im einzelnen wird die obige Aufgabe erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung eines neuen Makrolids der allgemeinen Formel (I)



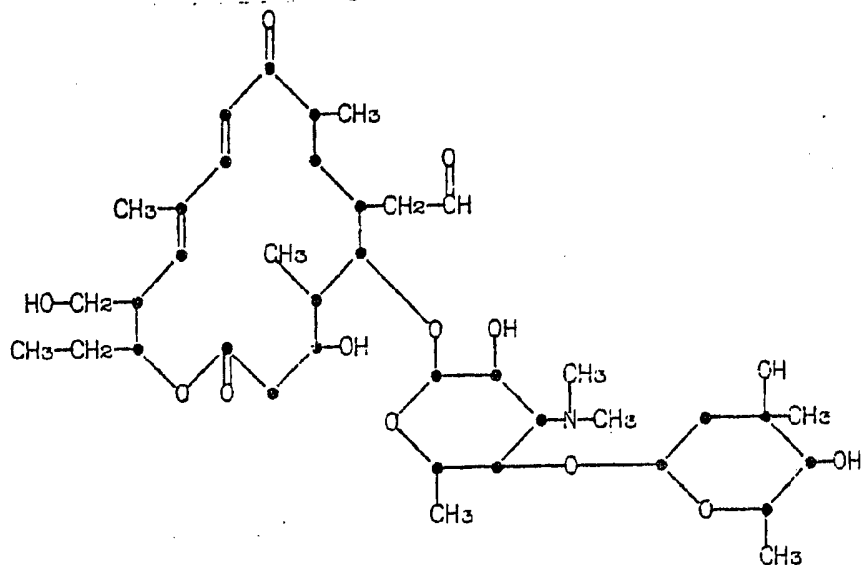
worin Q für $-\text{CH}_2\text{OH}$ oder $-\text{CHO}$ steht, oder eines Acylesters hiervon, oder von Säureadditionssalzen der obigen Verbindungen oder Estern hiervon, mit der Maßgabe, daß dann, falls die Stellung 3 des Moleküls von einer O-Acetylgruppe besetzt ist, die Stellung 4'' keine O-Isovalerylgruppe enthalten kann.

Für obige allgemeine Formel ist zwar keine stereochemische Konfiguration angegeben, doch ist diese selbstverständlich identisch mit der stereochemischen Konfiguration von Tylosin. Der Neutralzucker ist Mycarose und der Aminozucker Mycamino-se.

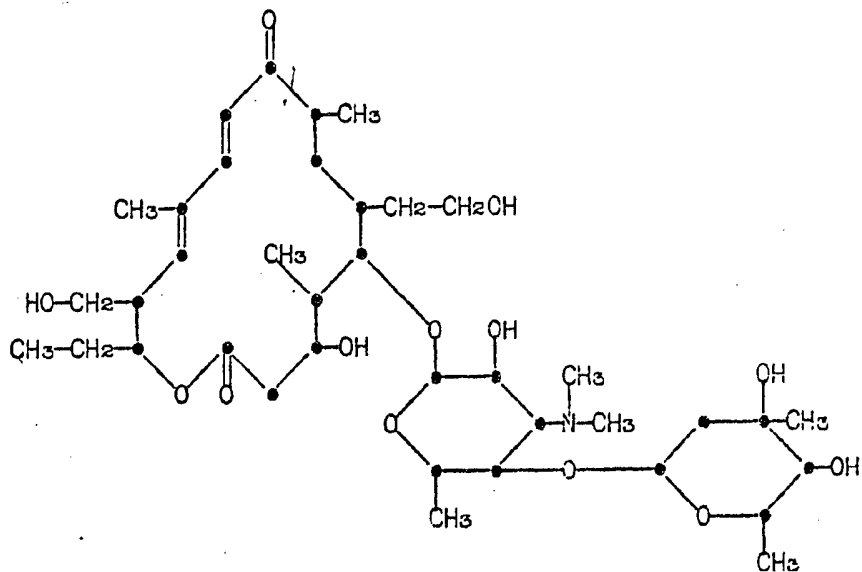
Steht in obiger allgemeiner Formel I der Rest Q für $-\text{CHO}$, dann ist das neue Makrolid 23-Demycinosyltylosin, das vorliegend einfach auch als Demycinosyltylosin oder DMT bezeichnet wird und die folgende Formel hat:

230761 4

- 4 -



Eine weitere erfindungsgemäß herstellbare Verbindung stellt das Dihydroderivat von DMT dar, nämlich das 20-Dihydro-23-demycinosyltylosin, welches im folgenden abgekürzt auch als Dihydro-DMT bezeichnet wird, ebenfalls ein antibiotisch wirksames Makrolid ist und die Struktur



hat.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen hemmen das Wachstum von Mikroorganismen, die für warmblütige Tiere pathogen sind. Sie stellen insbesondere antibakterielle Mittel dar, welche besonders wirksam sind gegenüber grampositiven Mikroorganismen und Arten von Mycoplasma.

Die Hydroxylgruppen von DMT und von Dihydro-DMT, nämlich die in den Stellungen 2', 4'', 3'', 23 und 3 befindlichen Hydroxylgruppen, lassen sich verestern, wodurch wertvolle Acylesterderivate gebildet werden. Ferner kann das Dihydro-DMT auch an der in Stellung 20 befindlichen Hydroxylgruppe verestert werden. Die Veresterung der Hydroxylgruppe in Stellung 2' verläuft am einfachsten. Beispiele für derartige Ester sind die Ester von Monocarbonsäuren oder die Halbestere von Dicarbonsäuren mit jeweils 2 bis 18 Kohlenstoffatomen.

Bei DMT, Dihydro-DMT und ihren Acylesterderivaten handelt es sich um basische Verbindungen, die sich durch Behandlung mit Säuren in Säureadditionssalze überführen lassen. Solche Säureadditionssalze gehören ebenfalls zur Erfindung. Wird im folgenden daher von DMT-Verbindungen gesprochen, dann versteht man hierunter DMT, Dihydro-DMT, ein bestimmtes Acylesterderivat dieser Verbindungen oder ein pharmazeutisch unbedenkliches Säureadditionssalz von DMT, Dihydro-DMT oder einem Acylesterderivat hiervon.

Die Erfindung bezieht sich ferner auch auf einen neuen Stamm von *Streptomyces fradiae*, nämlich den Stamm NRRL 12170 von *Streptomyces fradiae*, sowie auf ein Verfahren zur Herstellung von DMT oder Dihydro-DMT durch Züchtung dieses Stammes unter submersen aeroben Fermentationsbedingungen bis zur Bildung eines wesentlichen Ausmaßes an antibiotischer Aktivität. DMT oder Dihydro-DMT können aus dem basisch gestellten Filtrat oder Kulturbrühe mit polaren organischen Lösungsmitteln extrahiert, und sie können durch Extraktion, Adsorption und/oder Kristallisation weiter gereinigt werden.

Die Erfindung bezieht sich demnach auf verbesserte Verfahren zur Herstellung von 5-O-Mycaminosyltylonolid (OMT) und 20-Dihydro-5-O-mycaminosyltylonolid (Dihydro-OMT) durch schwach saure Hydrolyse von DMT oder Dihydro-DMT.

Dihydro-DMT lässt sich durch chemische Reduktion oder durch Fermentation erhalten. Die Herstellung von Dihydro-DMT durch chemische Reduktion erfolgt durch bekannte Verfahren, beispielsweise durch Behandlung mit einer etwa stöchiometrischen Menge eines chemischen Reduktionsmittels, wie Natriumborhydrid, in einem alkoholischen Lösungsmittel. Dihydro-DMT kann ferner auch durch Züchtung des vorliegenden Mikroorganismus *Streptomyces fradiae* NRRL 12170 unter gesteuerten Fermentationsbedingungen gebildet werden.

DMT und Dihydro-DMT können in ihren Stellungen 2', 4", 3", 23 und 3 durch übliche Behandlung mit Acylierungsmitteln verestert und hierdurch in die entsprechenden Acylesterderivate überführt werden. Dihydro-DMT lässt sich ferner auch in Stellung 20 verestern. Am einfachsten läuft die Veresterung der in Stellung 2' befindlichen Hydroxylgruppe. Zu hierfür geeigneten Acylierungsmitteln gehören beispielsweise Anhydride, Halogenide (gewöhnlich in Kombination mit einer Base oder einem anderen Säurefänger) und aktive Ester organischer Säuren. Ferner lassen sich solche Acylierungen auch unter Einsatz eines Gemisches aus einer organischen Säure und einem Dehydratisierungsmittel erreichen, wie N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid. Weiter können derartige Acylierungen auch enzymatisch durchgeführt werden, wie dies beispielsweise aus US-PS 4 092 473 hervorgeht. Die entsprechenden Acyl-derivate lassen sich nach ihrer Bildung in bekannter Weise abtrennen und reinigen.

Das 2'-Monoesterderivat lässt sich durch allgemein bekannte selektive Veresterungstechniken herstellen, beispielsweise

durch Behandlung des Antibiotikums mit einer stöchiometrischen Menge (oder einer leicht überschüssigen Menge) eines Acylierungsmittels, wie eines Acylanhydrids, bei etwa Raumtemperatur über eine Zeitdauer von etwa 1 bis 24 Stunden bis zur praktischen Beendigung der Veresterung. Der erhaltene 2'-Monoester kann aus dem Reaktionsgemisch durch übliche Verfahren isoliert werden, beispielsweise durch Extraktion, Chromatographie oder Kristallisation.

Brauchbare Acylester sind solche organischer Säuren unter Einschluß aliphatischer, cycloaliphatischer, arylischer, aralkylischer oder heterocyclischer Carbonsäuren, Sulfonsäuren und Alkoxy-carbonsäuren, die jeweils vorzugsweise 2 bis 18 Kohlenstoffatome, und insbesondere 2 bis 12 Kohlenstoffatome, enthalten.

Zu Beispielen für geeignete Ester gehören Ester von Säuren, wie Essigsäure, Chloressigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Isovaleriansäure, Alkoxy-carbonsäure, Stearinsäure, Cyclopropancarbonsäure, Cyclohexancarbonsäure, β -Cyclohexylpropionsäure, 1-Adamantylcarbonsäure, Benzoesäure, Phenylessigsäure, Phenoxyessigsäure, Mandelsäure oder 2-Thienylessigsäure, von Alkylsulfonsäuren, Arylsulfonsäuren oder Aralkylsulfonsäuren, wobei die Alkylsulfonsäuren und Aralkylsulfonsäuren an ihrem aromatischen Rest gegebenenfalls Substituenten enthalten können, wie Halogen, Nitro oder Niederalkoxy. Zu geeigneten Estern gehören ferner auch die Halbester von Dicarbonsäuren, wie Bernsteinsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Malonsäure oder Phthalsäure.

Pharmazeutisch unbedenkliche Esterderivate werden bevorzugt. Es sind jedoch auch andere Esterderivate geeignet, wenn auch nur als Zwischenprodukte.

DMT, Dihydro-DMT und ihre entsprechenden Acyllderivate bilden auch Säureadditionssalze. Die Säureadditionssalze von

DMT, Dihydro-DMT und ihren Acylderivaten gehören ebenfalls zur Erfindung. Solche Säureadditionssalze eignen sich beispielsweise zur Abtrennung, Reinigung und Kristallisation von DMT, Dihydro-DMT und ihren Acylderivaten. Darüber hinaus verfügen diese Salze auch über eine bessere Löslichkeit in Wasser.

Beispiele für geeignete Salze sind solche, die durch übliche Reaktion sowohl mit organischen Säuren als auch mit anorganischen Säuren gebildet werden, beispielsweise mit Schwefelsäure, Chlorwasserstoffsäure, Phosphorsäure, Essigsäure, Bernsteinsäure, Zitronensäure, Milchsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Palmitinsäure, Cholsäure, Pamoäsäure, Mucinsäure, D-Glutaminsäure, d-Camphersäure, Glutarsäure, Glykolsäure, Phthalsäure, Weinsäure, Ameisensäure, Laurinsäure, Stearinsäure, Salicylsäure, Methansulfonsäure, Benzolsulfonsäure, Sorbinsäure, Picrinsäure, Benzoesäure oder Zimtsäure.

Pharmazeutisch unbedenkliche Säureadditionssalze sind eine besonders bevorzugte Gruppe erfindungsgemäßer Salze. Hierunter werden Salze verstanden, die so wenig toxisch sind, daß sie sich zur chemotherapeutischen Behandlung von Bakterieninfektionen bei warmblütigen Tieren verwenden lassen.

Die Erfindung bezieht sich auf verbesserte Verfahren zur Herstellung von OMT und Dihydro-OMT durch schwach saure Hydrolyse von DMT oder Dihydro-DMT. OMT und Dihydro-OMT haben die gleichen Strukturen wie DMT und Dihydro-DMT mit der Ausnahme, daß die Mycarosylgruppe durch Wasserstoff ersetzt ist. Die hierfür anzuwendenden schwach sauren Hydrolysebedingungen sind bekannt. Zur Durchführung dieser Hydrolyse lassen sich entsprechende Lösungen mit einem pH-Wert von etwa 4 oder darunter verwenden. Es kann bei Temperaturen von etwa 20 bis 100°C gearbeitet werden. Die zur Durchführung dieser Hydrolyse erforderliche Umsetzungszeit ist abhängig vom pH-Wert des Reaktionsgemisches und der angewandten Temperatur.

Bei höheren pH-Werten ist die Reaktionsgeschwindigkeit langsamer, während die Umsetzung bei höheren Temperaturen rascher abläuft. Die Reaktion wird durchgeführt, indem man entweder DMT oder Dihydro-DMT solange mit einer schwach sauren Lösung behandelt, bis die Mycarosylgruppe entfernt und das gewünschte OMT oder Dihydro-OMT entstanden ist.

Wahlweise und gelegentlich auch vorzugsweise werden OMT oder Dihydro-OMT hergestellt, indem man DMT oder Dihydro-DMT in der Fermentationsbrühe, in welcher sie gebildet werden, solange bei den oben beschriebenen schwach sauren Bedingungen umsetzt, bis das DMT oder das Dihydro-DMT zu OMT oder Dihydro-OMT umgewandelt ist. Das auf diese Weise hergestellte OMT oder Dihydro-OMT läßt sich in bekannter Weise aus der Fermentationsbrühe isolieren.

OMT und Dihydro-OMT werden in US-PS 3 459 853 beschrieben. Sie werden demnach hergestellt durch gesteuerte saure Hydrolyse von Tylosin, Desmycosin, Macrocin, Lactenocin oder ihren Dihydroderivaten. Dieses bekannte Verfahren besteht in einer Entfernung aller neutralen Zucker von Tylosin, Desmycosin, Macrocin oder Lactenocin unter Bildung von OMT. In analoger Weise erfolgt auch die Herstellung von Dihydro-OMT. Die Entfernung des neutralen Zuckers in Stellung 23 macht Bedingungen erforderlich, die zu beachtlichen Produktverlusten führen. Solche Produktverluste werden nun durch das vorliegende Verfahren vermieden.

Die Erzeugung von DMT und Dihydro-DMT erfolgt, wie oben bereits erwähnt, durch Züchtung eines diese Verbindungen produzierenden Stammes von *Streptomyces fradiae* unter submersen aeroben Bedingungen in einem geeigneten Kulturmedium bis zur Erzeugung einer wesentlichen antibiotischen Aktivität. Hierbei wird natürlich das DMT zuerst gebildet. Das Dihydro-DMT entsteht dann, wenn die Fermentation über eine längere

Zeitdauer durchgeführt wird, so daß es zu einer enzymatischen Reduktion des vorhandenen DMT kommen kann.

Zum Wachsen von *Streptomyces fradiae* NRRL 12170 läßt sich irgendeines der verschiedenen Kulturmedien verwenden. Aus Gründen einer wirtschaftlichen Produktion, optimalen Ausbeute und leichten Isolierung des gewünschten Produkts werden jedoch bestimmte Kulturmedien bevorzugt. Zu bevorzugten Kohlenstoffquellen für eine großtechnische Fermentation gehören beispielsweise Kohlehydrate, wie Dextrin, Glucose, Stärke oder Maismehl, oder auch Öle, wie Sojabohnenöl. Zu bevorzugten Stickstoffquellen gehören Maismehl, Sojabohnenmehl, Fischmehl oder Aminosäuren. Zu den anorganischen Nährsalzen, die den Kulturmedien einverleibt sein können, gehören die üblichen löslichen Salze, welche beispielsweise Ionen von Eisen, Kalium, Natrium, Magnesium, Calcium, Ammonium, Chlorid, Carbonat, Sulfat oder Nitrat liefern.

Im Kulturmedium sollen ferner auch essentielle Spurenelemente vorhanden sein, die zum Wachstum und zur Entwicklung des Mikroorganismus erforderlich sind. Solche Spurenelemente kommen gewöhnlich als Verunreinigungen in anderen Bestandteilen des Mediums in so hoher Menge vor, wie sie für ein Wachsen des Mikroorganismus erforderlich sind. Besteht das Problem einer zu starken Schaumbildung, dann kann erforderlichenfalls der Zusatz kleiner Mengen (nämlich Mengen von etwa 0,2 ml/l) eines Antischaummittels, wie Polypropylenglykol (mit einem Molekulargewicht von etwa 2000) zu großtechnischen Fermentationsmedien erforderlich sein.

Zur Bildung wesentlicher Mengen an DMT oder Dihydro-DMT wird eine submerse aerobe Fermentation in Tanks bevorzugt. Kleine Mengen an DMT oder Dihydro-DMT lassen sich auch durch Züchtung in Schüttelkolben erreichen. Infolge der verzögerten Produktion des Antibiotikums bei einer Beimpfung großer

Tanks mit der Sporenform des Organismus wird vorzugsweise ein vegetatives Impfgut verwendet. Die Herstellung eines solchen vegetativen Inoculums erfolgt durch Beimpfen eines kleinen Volumens an Kulturmedium mit der Sporenform oder mit Mycelbruchstücken des Organismus, wodurch man zu einer frischen und aktiv wachsenden Kultur des Organismus gelangt. Das hierdurch erhaltene vegetative Inoculum läßt sich dann in einen größeren Tank übertragen. Das für das vegetative Inoculum verwendete Medium kann das gleiche sein wie es auch für größere Fermentationen verwendet wird, es lassen sich hierfür jedoch auch andere Medien einsetzen.

Streptomyces fradiae NRRL 12170 kann bei Temperaturen zwischen etwa 10 und 37°C wachsen. Zu einer optimalen Bildung an Antibiotikum scheint es bei einer Temperatur von etwa 28°C zu kommen.

Wie bei aeroben submersen Züchtungsverfahren üblich, wird auch bei vorliegendem Verfahren durch das Kulturmedium sterile Luft geblasen. Für eine entsprechend wirksame Bildung an Antibiotikum soll die prozentuale Luftsättigung bei einer Tankproduktion etwa 30 % oder darüber betragen (bei 28°C und 1 bar Druck).

Die Bildung des Antibiotikums läßt sich während der Fermentation verfolgen, indem man Proben der Brühe gegenüber Organismen untersucht, von denen man weiß, daß sie gegen diese Organismen empfindlich sind. Ein hierzu brauchbarer Versuchsorganismus ist *Staphylococcus aureus* ATCC 9144. Der Bioversuch wird normalerweise durch eine automatische turbidometrische Methode durchgeführt. Darüber hinaus läßt sich die Bildung an Antibiotikum auch ohne weiteres durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie unter UV-Detektion überwachen.

Nach erfolgter Bildung unter submersen aeroben Fermentationsbedingungen kann man das DMT oder das Dihydro-DMT unter Anwendung von in der Fermentationstechnik üblichen Methoden aus dem Fermentationsmedium gewinnen. Der Gewinnung von DMT oder Dihydro-DMT geht eine anfängliche Filtration der Fermentationsbrühe voran. Die hierdurch erhaltene filtrierte Brühe läßt sich dann gewünschtenfalls weiter reinigen, wodurch man zum gewünschten Antibiotikum gelangt. Diese Reinigung kann unter Anwendung der verschiedensten Techniken durchgeführt werden. Ein bevorzugtes Reinigungsverfahren für die filtrierte Brühe besteht darin, daß man den pH-Wert der Brühe auf 9 einstellt, die Brühe mit einem geeigneten Lösungsmittel extrahiert, wie Ethylacetat, Amylacetat oder Methylisobutylketon, die organische Schicht mit einer wäßrigen sauren Lösung extrahiert und das Antibiotikum dann durch Basischstellen des wäßrigen Extrakts ausfällt. Das hierdurch erhaltene Antibiotikum kann gewünschtenfalls dann durch Extraktion, Adsorption und/oder Umfällung weiter gereinigt werden.

Der erfindungsgemäße neue Mikroorganismus wird erhalten durch chemische Mutagenese eines tylosinproduzierenden Stammes von *Streptomyces fradiae*. Der durch Mutagenese erhaltene Mikroorganismus produziert lediglich minimale Mengen Tylosin, bildet DMT jedoch als überwiegende Komponente.

Der neue Organismus ist zur Charakterisierung mit dem Stamm *Streptomyces fradiae* M48-E 2724.1 verglichen worden, nämlich einem von *Streptomyces fradiae* NRRL 2702 abgeleiteten tylosinproduzierenden Stamm. Der Stamm *Streptomyces fradiae* NRRL 2702 wird in US-PS 3 178 341 beschrieben. Die tylosinproduzierende Kultur von *Streptomyces fradiae* M48-E 2724.1 wird im folgenden auch einfach als E2724.1 bezeichnet.

Der neue DMT und Dihydro-DMT produzierende Stamm NRRL 12170

stellt ebenfalls einen Stamm von *Streptomyces fradiae* dar. Die Charakterisierung dieses Mikroorganismus erfolgte unter Anwendung der vom Internationalen Streptomyces Projekt zur Charakterisierung von Streptomyces-Arten empfohlenen Methoden (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. Auflage, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md., 1974, Seite 815, und Internal. Journal of Systematic Bacteriology 18 (2), 118, (1968)).

Die folgende Beschreibung des DMT-produzierenden Stammes stellt einen Vergleich seiner charakteristischen Eigenschaften mit den Eigenschaften des tylosinproduzierenden Stammes *Streptomyces fradiae* E2724.1 dar.

Die Sporenkettenmorphologie des neuen Stammes und des Stammes E2724.1 liegt im Abschnitt des Retinaculum-Apertum (RA). Die Haken, Schlaufen und irregulären Spiralen sind kurz und haben im allgemeinen keinen großen Durchmesser. Dies läßt sich am besten auf ISP#2 beobachten (Hefe-Malzextrakt-Agar). Die Sporenoberfläche ist glatt. Die Sporenform ist sphärisch mit einer mittleren Größe von 0,65 μm Durchmesser. Der Durchmesserbereich liegt zwischen 0,61 und 0,71 μm .

Die auffälligsten Unterschiede zwischen diesen Stämmen liegen in ihren Züchtungseigenschaften. Der Stamm E2724.1 bildet auf den meisten Medien ziemlich leicht Luftmycelien und ist weiß gefärbt. Der DMT-produzierende Stamm bildet, wenn überhaupt, nur sehr wenig Luftmycelien. Diese sind dann weiß bis grau gefärbt. Auf den Unterseiten dieser Kolonien sind keine unterscheidbaren Pigmente vorhanden. Sie sind hell bis mittelgelb gefärbt. Die Bildung an Melanoidpigment ist negativ¹.

¹Die Bildung an Melanoidpigment wird unter Verwendung von ISP#1 (Trypton-Hefeextrakt-Brühe), ISP#6 (Pepton-Hefeextrakt-Eisen-Agar), ISP#7 (Tyrosin-Agar) und ISP#7 Agar ohne Tyrosin untersucht.

Die wichtigen Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen dem Stamm E2724.1 und dem erfindungsgemäßen Stamm gehen aus der folgenden Tabelle I hervor.

Tabelle IVergleich zwischen Streptomyces fradiae E2724.1 und NRRL 12170

<u>Ähnlichkeiten</u>	<u>Unterschiede</u>
Sporenkettenmorphologie	Kulturcharakteristiken
Sporenoberflächenornamentierung	NaCl-Verträglichkeit
Sporengröße	pH-Bereich
Fehlen von Chromogenität	Temperaturbereich
Fehlen löslicher Pigmente	Kohlenstoffverwertung
Wachstum in ausgewählten vegetativen Medien	Gelatineverflüssigung
Stärkehydrolyse	
Negative Reaktion in Magermilch	
Nitratreduktion	
Positive Katalase	
Positive Phosphatase	
Negative Urease	
Antibiotisches Empfindlichkeitsmuster	

Wachstumscharakteristiken und Morphologie der Stämme *Streptomyces fradiae* E2724.1 und NRRL 12170 gehen vergleichsweise aus der folgenden Tabelle II hervor. In den sich daran anschließenden Tabellen sind vergleichend die antibiotischen Empfindlichkeiten (Tabelle III), die Kohlenstoffverwertung (Tabelle IV) und verschiedene physiologische Eigenschaften (Tabelle V) angegeben.

Tabelle II

Wachstumscharakteristiken und Morphologie

	E2724.1	NRRL 12170
Sporophoren	RA	RA
Sporenketten	>10	>10
Sporenoberfläche ¹	glatt	glatt
Sporenform	sphärisch	sphärisch
ISP#2	G ² gut R 87. m. gelb ³ Am gut 263. weiß Sp nichts	gut 87. m. gelb ausreichend 263. weiß nichts
ISP#3	G schlecht R 263. weiß Am schlecht 263. weiß Sp nichts	schlecht 263. weiß Spur nichts
ISP#4	G reichlich R 87. m. gelb Am reichlich 263. weiß Sp nichts	gut 87. m. gelb schlecht nichts

Tabelle IIWachstumscharakteristiken (Fortsetzung)

		E2724.1	NRRL 12170
ISP#5	G	gut	gut
	R	86.1 gelb	86.1 gelb
	Am	gut 92. Y. weiß	nichts
	Sp	nichts	nichts
ISP#7	G	reichlich	gut
	R	87. m. gelb	87. m. gelb
	Am	reichlich 263. weiß	ausreichend 265. mittelgelb
	Sp	nichts	hellbraun
Bennett	G	schlecht	kein Wachstum
	R	90. gy. gelb	-
	Am	nichts	-
	Sp	nichts	-
Calciummalat	G	gut	schlecht
	R	263. weiß	92. Y. weiß
	Am	gut 263. weiß	keines
	Sp	nichts	keines
Czapek	G	gut	ausreichend
	R	87. m. gelb	87. m. gelb
	Am	reichlich 263. weiß	Spur
	Sp	keines	nichts

Tabelle II

Wachstumscharakteristiken (Fortsetzung)

		E2724.1		NRRL 12170	
		kein Wachstum		kein Wachstum	
Glucose-Asparagin	G	--		--	
	R	--		--	
	Am	--		--	
	Sp	--		--	
Tomatenpaste-Hafermehl	G	reichlich		gut	
	R	92. Y. weiß		87. m. gelb	
	Am	reichlich 263. weiß		nichts	
	Sp	nichts		nichts	

¹ Die Oberflächenornamentierung wird unter Verwendung eines Abtastelektronenmikroskops bestimmt.

² G = Wachstum, R = Rückseite oder Unterseite der Kolonie, Am = Luftmycel, Sp = lösliches Pigment

³ Die Zuordnung der Farbzeichnungen erfolgt unter Verwendung der Farbkarten ISCC-NBS. (K. L. Kelly und D. B. Judd, "The ISCC-NBS Centroid Color Charts Standard Sample No. 2106," U.S. Dept. of Commerce, National Bureau of Standards, Washington, D.C. 20234

Tabelle III

Antibiotische Empfindlichkeit^{a, b}

Antibiotikum	Konzentration	Verbindungs-kategorie	E2724.1	NRRL 12170
Chloramphenicol	30 µg	Nitrophenyl	+	+
Erythromycin	15 µg	Makrolid	S	S
Cephaloridin	30 µg	β-Lactam	+	+
Lincomycin	2 µg	Lincosaminid	-	-
Polymyxin B	300 Einheiten	Peptid	S	S
Streptomycin	10 µg	Aminoglycosid	+	+
Tetracyclin	30 µg	Tetracyclin	+	+
Vancomycin	30 µg	Glycopeptid	+	+

^a Bestimmt unter Verwendung von Empfindlichkeitsscheiben, die auf angeimpfte Agarplatten geklotzt sind.

^b - = Resistenz (keine Hemmzonen)

+ = Empfindlichkeit (Hemmzonen)

S = Spur an Empfindlichkeit

Tabelle IV

Kohlenstoffverwertung^{a, b}

<u>Kohlenstoffquelle</u>	<u>E2724.1</u>	<u>NRRL 12170</u>
Kontrolle: Kein Kohlenstoff	-	-
Kontrolle: Glucose	+	+
L-Arabinose	-	-
D-Fructose	+	+
D-Galactose	+	+
i-Inosit	+	+
D-Mannit	-	-
Raffinose	-	-
Salicin	-	-
Sucrose	+	+
D-Xylose	+	+
D-Rhamnose	-	-

a. - = Keine Verwertung
+ = Verwertung

b. Bestimmt unter Verwendung von Grundmedium gemäß dem Internationalen Streptomyces Projekt (ISP)#9 (Kohlenstoffverwertungsagar) unter Zusatz von durch Filtern sterilisierten Kohlenstoffquellen bis zu einer Endkonzentration von 1,0 %. Die Platten werden bei 30°C bebrütet und nach 7 Tagen sowie nach 12 Tagen ausgewertet.

Tabelle V

Verschiedene physiologische Eigenschaften

	<u>E2724.1</u>	<u>NRRL 12170</u>
ISP#1 (Chromogenität)	-	-
ISP#6 (Chromogenität)	-	-
ISP#7 (Chromogenität)	-	-
Gelatineverflüssigung	-	-
Reaktion in Magermilch	-	-
pH-Wachstumsbereich ^{1,2}	6,1 bis 8,8	6,1 bis 7,8
Temperaturwachstumsbereich ^{1,3}	10 bis 37°C	10 bis 30°C
NaCl-Verträglichkeit ^{1,4}	8 ‰	4 ‰
Stärkehydrolyse ⁵	+	+
Nitratreduktion	+	+
Katalase ⁶	+	+
Phosphatase ⁶	+	+
Urease ⁶	-	-

¹ Bestimmt unter Verwendung von Medium ISP#2 (Hefeextrakt-Malzextrakt-Agar) sowie unter 7-tägiger Bebrütung.

² Ermittelt unter Verwendung folgender Puffer in einer jeweils 0,05-molaren Konzentration: Zitronensäure, pH-Werte 3, 4 und 5; 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, pH-Wert 6; 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure, pH = 7; N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure, pH = 8; 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol, pH = 9; 3-Cyclohexylamino-1,1-propansulfonsäure, pH = 10, 11.

Tabelle V (Fortsetzung)

Der pH-Wert des Agars nach 7-tägiger Bebrütung wird als korrekter Wert angesehen, da einige der verwendeten Puffer ihren eingestellten pH-Wert nicht beibehalten. Die Toxizität der Puffer wird ermittelt, indem man alle Puffer auf pH 7,0 einstellt und das Wachstum untersucht. Hierbei läßt sich keinerlei Toxizität beobachten.

³Untersucht bei 5, 10, 15, 20, 25, 30, 37, 40, 45, 50 und 55°C

⁴Gemessen durch Zugabe von Natriumchlorid zum Agar in folgenden Mengen: 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 12 Gew.-%

⁵Die Bestimmung der Stärkehhydrolyse erfolgt durch Untersuchung der Anwesenheit von Stärke mittels Iod auf Platten von ISP#4 (anorganische Salze-Stärke-Agar)

⁶Die Enzymuntersuchungen werden unter Befolgung der Methoden von Blazevic und Ederer durchgeführt (D. J. Blazevic und G. M. Ederer, "Principles of Biochemical Tests in Diagnostic Microbiology," John Wiley and Sons, New York, N.Y., 1975).

Auf Basis der oben angeführten charakteristischen Eigenschaften wird der DMT- und Dihydro-DMT -bildende Mikroorganismus, nämlich der Organismus NRRL 12170, als neuer Stamm von *Streptomyces fradiae* klassifiziert. Er ist in der Kultursammlung von Northern Regional Research Center, Agricultural Research, North Central Region, 1815 North University Street, Peoria, Illinois, 61604, hinterlegt und kann von dort unter der Nummer NRRL 12170 frei bezogen werden.

Der Mikroorganismus *Streptomyces fradiae* NRRL 12170 ist genauso wie auch andere Organismen einer Variation zugänglich. So lassen sich beispielsweise Rekombinanten, Mutanten oder künstliche Varianten des Stammes NRRL 12170 herstellen, indem man diesen Stamm mit verschiedenen bekannten physikalischen und chemischen mutagenen Mitteln behandelt, wie beispielsweise Ultraviolettlicht, Röntgenstrahlen, Gammastrahlen oder N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin. Alle natürlichen und künstlichen Varianten, Mutanten und Rekombinanten von *Streptomyces fradiae* NRRL 12170, die die charakteristische Bildung von DMT beibehalten, können erfindungsgemäß verwendet werden.

Die DMT-Verbindungen hemmen das Wachstum pathogener Bakterien, und zwar insbesondere grampositiver Bakterien und Species von *Mycoplasma*. Aus der folgenden Tabelle VI gehen beispielsweise die Werte für die minimalen Hemmkonzentrationen (MIC-Werte) hervor, gemessen durch die üblichen Agar-Verdünnungs-Versuche, in denen DMT (freie Base) bestimmte Bakterien hemmt.

Tabelle VIWirksamkeit der freien Base von DMT in vitro

<u>Organismus</u>	<u>MIC (µg/ml)</u>
<u>Streptococcus pyogenes</u> C203	0,25
<u>Streptococcus pneumoniae</u> Park I	0,13
<u>Streptococcus</u> sp. (Group D) 282	0,5
<u>Staphylococcus aureus</u> 3055	1,0
<u>Pasteurella multocida</u>	6,25
<u>Pasteurella hemolytica</u>	25,00
<u>Mycoplasma gallisepticum</u>	0,097
<u>Mycoplasma hyopneumoniae</u>	0,39
<u>Mycoplasma hyorhinis</u>	0,78

(MIC = Minimale Hemmkonzentration)

Die DMT-Verbindungen haben sich auch in vivo gegenüber experimentellen Bakterieninfektionen als antibiotisch wirksam erwiesen. Zu diesem Zweck verabreicht man Mäusen mit experimentell hervorgerufenen Infektionen zwei Dosen der jeweils zu untersuchenden Verbindung und ermittelt die sich hierdurch ergebende Wirksamkeit in Form des jeweiligen ED₅₀-Wertes (wirksame Dosis in mg/kg, die einen 50 %-igen Schutz der untersuchten Tiere ergibt, J. Bacteriol. 81, 233 bis 235 (1961)). Die für DMT und DMT-Tartrat beobachteten ED₅₀-Werte gehen aus der folgenden Tabelle VII hervor.

Tabelle VII

Verbindung	Subkutane und orale ED ₅₀ -Werte (mg/kg x 2)					
	Streptococcus pyogenes C203		Streptococcus pneumoniae Park I		Staphylococcus aureus 3055	
	Subkutan	Oral	Subkutan	Oral	Subkutan	Oral
DMT-Base	2,2	218	15,7	66	2,7	64
DMT-Tartrat	2,3	172	≤9,9	100	NU*	NU
Bakterielle Herausforderung (x·LD ₅₀)	13	11,3	3	2,7	21	26

*NU = nicht untersucht

Die Wirksamkeit gegenüber Arten von *Mycoplasma* ist eine besonders interessante Eigenschaft der vorliegenden DMT-Verbindungen. Aus den folgenden Tabellen VIII und IX geht eine Zusammenfassung von Untersuchungsergebnissen unter Verwendung von DMT und DMT-Tartrat bei der Behandlung von mit *Mycoplasma gallisepticum* bei Hühnchen hervorgerufenen Infektionen hervor. Die Verabreichung der jeweiligen Verbindungen erfolgt zusammen mit dem Trinkwasser (0,25 und 0,5 g/l über eine Zeitdauer von 1 bis 3 Tagen) oder durch Injektion in einer Menge von 15 oder 30 mg/kg Körpergewicht.

Tabelle VIII

Behandlung einer durch Mycoplasma gallisepticum hervorgerufenen Infektion bei Hühnchen mit DMT-Base					
<u>Verbindung</u>	<u>Dosierung</u>	<u>Anzahl toter Tiere durch Gesamtan- zahl der Tiere</u>	<u>Anzahl der Tiere mit Luftsackver- letzungen durch An- zahl der gesamten Tiere</u>	<u>Mittleres Gewicht (g)</u>	<u>Anzahl der Tiere mit Antikörpern gegen Myo- plasma gallisepticum durch Gesamtanzahl der Tiere</u>
DMT-Base	0,5 g/l, 1 bis 3 Tage	9/30 (30 %)	26/30 (86,7 %)	397	21/21 (100 %)
DMT-Base	0,25 g/l, 1 bis 3 Tage	13/30 (43,3 %)	28/30 (93,3 %)	392	15/17 (88,2 %)
DMT-Base	15 mg/kg	10/30 (33,3 %)	24/30 (80 %)	453	20/20 (100 %)
Infizierte Kontrolle	—	19/30 (63 %)	30/30 (100 %)	304	11/11 (100 %)

Tabelle IX

Behandlung einer durch Mycoplasma gallisepticum hervorgerufenen Infektion bei Hühnchen mit DMT-Base					
Verbindung	Dosierung	Anzahl toter Tiere durch Gesamtanzahl der Tiere	Anzahl der Tiere mit Luftsackver- letzungen durch An- zahl der gesamten Tiere	Mittleres Gewicht (g)	Anzahl der Tiere mit Antikörpern gegen Myco- plasma gallisepticum durch Gesamtanzahl der Tiere
DMT-Tartrat	0,5 g/l, 1 bis 3 Tage	0/30 (0 %)	13/30 (43,3 %)	458	17/30 (56,7 %)
DMT-Tartrat	0,25 g/l, 1 bis 3 Tage	2/30 (6,7 %)	22/29 (75,9 %)	354	27/28 (96,4 %)
DMT-Tartrat	30 mg/kg	10/30 (33,3 %)	27/30 (90 %)	330	16/20 (80 %)
Infizierte Kontrolle	--	15/30 (50 %)	30/30 (100 %)	231	15/15 (100 %)

Zur Verhinderung oder Behandlung von Infektionen durch Mycoplasma bei Geflügel verabreicht man solchen Tieren oral oder parenteral eine wirksame nichttoxische Menge einer DMT-Verbindung. Die DMT-Verbindungen werden meistens zusammen mit einem pharmazeutisch unbedenklichen Träger verabfolgt, beispielsweise dem Trinkwasser der Tiere.

Untersuchungen der akuten Toxizität von DMT gehen aus der folgenden Tabelle X hervor. Für diese Untersuchungen werden 4 bis 5 Wochen alte Mäuse (Harlan-ICR-Mäuse) verwendet. Die Bestimmung der mittleren lethalen Dosis (LD_{50}) für DMT erfolgt durch orale (p.o.), subkutane (s.c.), intravenöse (i.v.) und intraperitoneale (i.p.) Verabreichung.

Tabelle X

Akute Toxizität von DTM

<u>Verabreichungsart</u>	<u>LD_{50} (mg/kg)</u>	
	<u>Hähnchen</u>	<u>Hühnchen</u>
p.o.	--	über 5000
s.c.	--	5447
i.v.	100	186
i.p.	721	325

Zur Behandlung von Erkrankungen bei warmblütigen Tieren werden die vorliegenden Verbindungen selbstverständlich in Form veterinärer Formulierungen verabreicht. Zur Erfindung gehört daher auch eine veterinäre Formulierung aus einer Verbindung der allgemeinen Formel (I) oder einem pharmazeutisch unbedenklichen Salz oder Ester hiervon als Wirkstoff in Verbindung mit wenigstens einem geeigneten inerten Träger hierfür.

Die bei solchen Formulierungen zu verwendenden Träger entsprechen in ihrer Art selbstverständlich weitgehend den Trägern, wie sie bereits zusammen mit Tylosin eingesetzt werden.

Ausführungsbeispiele:

Die Erfindung wird im folgenden anhand von Beispielen weiter erläutert.

B e i s p i e l 1

A. Schüttelkolbenfermentation von DMT

Ein lyophilisiertes Pellet von *Streptomyces fradiae* NRRL 12170 wird in 1 bis 2 ml sterilem Wasser dispergiert. Mit einer Teilmenge der hierdurch erhaltenen Lösung (0,5 ml) beimpft man dann ein vegetatives Medium (150 ml) folgender Zusammensetzung:

<u>Bestandteile</u>	<u>Menge (%)</u>
Maisquellwasser	1,0
Hefeextrakt	0,5
Sojabohnenschrot	0,5
CaCO ₃	0,3
Sojabohnenöl (roh)	0,45
Deionisiertes Wasser	97,25

Statt dessen kann man auch eine in flüssigem Stickstoff aufbewahrte vegetative Kultur von *Streptomyces fradiae* NRRL 12170 in jeweils einem Volumen von 1 ml verwenden, rasch auftauen und zum Beimpfen des vegetativen Mediums verwenden.

Das inokulierte vegetative Medium wird in einem 500 ml fassenden Erlenmeyer-Kolben bei 29°C über eine Zeitdauer von etwa 48 Stunden in einem verschlossenen Schüttelkasten bei einer Geschwindigkeit von 300 UpM bebrütet.

Mit dem hierdurch erhaltenen bebrüteten vegetativen Medium (0,5 ml) beimpft man dann 7 ml eines Produktionsmediums folgender Zusammensetzung:

<u>Bestandteile</u>	<u>Menge (%)</u>
Rübenmelasse	2,0
Maismehl	1,5
Fischmehl	0,9
Maisgluten	0,9
NaCl	0,1
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,04
CaCO_3	0,2
Sojabohnenöl (roh)	3,0
Deionisiertes Wasser	91,36

Das inokulierte Fermentationsmedium wird in einem 50 ml fassenden Kolben bei 29°C über eine Zeitdauer von etwa 6 Tagen auf einen geschlossenen Kastenschüttler bei einer Geschwindigkeit von 300 UpM bebrütet.

B. Tankfermentation von DMT

Zur Bildung eines größeren Volumens an Inoculum verwendet man 1200 ml des inkubierten vegetativen Mediums, das in ähnlicher Weise wie oben unter Abschnitt A. beschrieben hergestellt wird, zum Beimpfen von 950 l eines vegetativen Wachstumsmediums der zweiten Stufe mit folgender Zusammensetzung:

<u>Bestandteile</u>	<u>Menge (%)</u>
Maisquellwasser	1,0
Sojabohnenölmehl	0,5
Hefeextrakt	0,5
CaCO ₃	0,3
Sojabohnenöl (roh)	0,5
Lecithin (roh)	0,015
Wasser	97,185

Der pH-Wert wird mit 50 %-iger Natriumhydroxidlösung auf 8,5 eingestellt.

Dieses vegetative Medium der zweiten Stufe wird in einem 1330 l fassenden Tank etwa 48 Stunden bei 28°C unter ausreichender Belüftung und Rührung bebrütet.

Mit dem auf diese Weise erzeugten inkubierten Medium der zweiten Stufe (547 l) beimpft man hierauf 3800 l steriles Produktionsmedium folgender Zusammensetzung:

<u>Bestandteile</u>	<u>Menge (%)</u>
Fischmehl	0,875
Maismehl	1,5
Maisgluten	0,875
CaCO ₃	0,2
NaCl	0,1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,04
Rübenmelasse	2,0
Sojabohnenöl (roh)	3,0
Lecithin	0,09
Wasser	91,32

Der pH-Wert wird mit 50 %-iger Natriumhydroxidlösung auf 7,2 eingestellt.

Man läßt das inokulierte Produktionsmedium in einem 6000 l fassenden Tank etwa 8 bis 9 Tage bei 28°C fermentieren. Das Fermentationsmedium wird mit steriler Luft belüftet, um hierdurch die Menge an gelöstem Sauerstoff zwischen etwa 30 und 50 % zu halten, und es wird mittels herkömmlicher Rührer bei einer Geschwindigkeit von etwa 250 UpM gerührt.

B e i s p i e l 2

Isolierung von DMT

Die nach Beispiel 1 erhaltene geerntete Gesamtbrühe (3800 l) wird mittels einer Filterhilfe filtriert. Der Mycelkuchen wird mit Wasser gewaschen und das Waschwasser zum Filtrat gegeben.

Der pH-Wert des Filtrats wird mit 50 %-iger wäßriger Lösung von Natriumhydroxid (9,5 l) auf 9,2 eingestellt, worauf man das Filtrat mit Ethylacetat (2000 l) extrahiert. Der Ethylacetatextrakt wird mit deionisiertem Wasser (450 l) und 1-basischem Natriumphosphat (6,4 kg) versetzt, und die erhaltene Lösung wird gründlich durchmischt. Anschließend stellt man den pH-Wert dieser Lösung von pH 6,0 unter Verwendung einer Phosphorsäurelösung (3300 ml, 2 Teile Wasser auf 1 Teil Phosphorsäure) auf pH 4,35 ein. Sodann wird die wäßrige Schicht abgetrennt. Der pH-Wert der angereicherten wäßrigen Schicht wird mittels 50 %-iger wäßriger Natriumhydroxidlösung (700 ml) auf pH 6,5 eingestellt.

Die erhaltene Lösung wird sodann unter Vakuum auf ein Volumen von etwa 225 l konzentriert. Der pH-Wert der konzentrierten Lösung wird durch Zugabe von 10 %-igem wäßrigem Natriumhydroxid (16 l) auf 9,2 eingestellt. Die basische Lösung läßt man dann über Nacht stehen. Die entstandenen Kristalle werden abfiltriert, mit deionisiertem Wasser (50 l) gewaschen und getrocknet, wodurch man zu etwa 8,6 kg Produkt gelangt. Ein Teil dieses Produkts (3 kg) wird aus einem Gemisch aus Aceton und Wasser umkristallisiert, wodurch man etwa 2,07 kg freie Base von DMT erhält.

DMT erweicht bei etwa 132°C und schmilzt langsam bis zu etwa 150°C. Eine Elementaranalyse von DMT ergibt folgende

ungefähre prozentuale Zusammensetzung: Kohlenstoff = 61 %, Wasserstoff = 8,5 %, Stickstoff = 2 %, Sauerstoff = 28 %. DMT hat eine empirische Formel von $C_{38}H_{63}NO_{13}$ und ein Molekulargewicht von etwa 742 (741 durch Massenspektrometrie bestimmt).

Das Infrarotspektrum der freien Base von DMT in Chloroform geht aus der beiliegenden Zeichnung hervor. Es lassen sich Absorptionsmaxima bei folgenden Frequenzen (cm^{-1}) beobachten: 3634 (sehr schmal), 3559 (Schulter), 3423 (breit), 2955 (stark), 2907 (stark), 1710 (stark), 1676 (Schulter), 1588 (stark), 1447 (Schulter), 1396 (Schulter), 1359 (schmal), 1309 (sehr schmal), 1178 (Schulter), 1156 (stark), 1111 (Schulter), 1072 (Schulter), 1048 (stark), 1013 (Schulter), 984 (Schulter), 926 (sehr schmal), 898 (sehr schmal) und 833 (sehr schmal).

Das Ultraviolettabsorptionsspektrum von DMT in neutralem Ethanol zeigt ein Absorptionsmaximum bei 283 nm ($\epsilon = 22\,296$, $E_{1\,cm}^{1\%} = 300,9$).

Die freie Base von DMT hat folgenden spezifischen Drehwert:

$$[\alpha]_D^{25} = 53,5^\circ \quad (c = 1, CH_3OH).$$

Eine elektrometrische Titration von DMT in 66 %-igem wäßrigem Dimethylformamid zeigt die Gegenwart einer titrierbaren Gruppe mit einem pK_a -Wert von etwa 7,25.

Die Base von DMT ist in Wasser und den meisten organischen Lösungsmitteln löslich, wie Aceton, Methanol, Ethanol, Chloroform, Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxid. Die Säureadditionssalze von DMT sind in Wasser besser löslich als die Base von DMT.

DMT lässt sich von Tylosin und anderen bekannten Faktoren von Tylosin durch Papierchromatographie und Dünnschichtchromatographie unterscheiden. Die ungefähren Rf- und Rx-Werte von DMT und verschiedenen anderen Tylosinfaktoren gehen aus den folgenden Tabellen XI und XII hervor. Der in Tabelle XII enthaltene Rx-Wert entspricht dem Verhältnis der Bewegung in bezug auf die Bewegung von Tylosin, welchem der Wert 1,0 zugeordnet worden ist. Die Detektion erfolgt bioautographisch unter Verwendung von *Bacillus subtilis*.

Tabelle XI

Dünnschichtchromatographie von DMT^a

<u>Verbindung</u>	<u>Rf-Werte</u>		
	<u>A^b</u>	<u>B</u>	<u>C</u>
Tylosin	0,53	0,53	0,67
DMT	0,45	0,52	0,61
Desmycosin	0,47	0,24	0,17
Macrocin	0,23	0,49	0,60
Relomycin	0,34	0,51	0,63

^aMedium: Merck, Darmstadt - Silicagel 60

^bLösungsmittel: A = Ethylacetat:Diethylamin (96:4)

B = Aceton:Ethanol (2:1)

C = Chloroform:Methanol (3:1)

Tabelle XIIPapierchromatographie von DMT

<u>Verbindung</u>	<u>Rx-Werte</u>	
	<u>D</u> ^b	<u>E</u>
Tylosin	1,0	1,0
DMT	0,76	0,95
Desmycosin	0,22	0,83
Macrocin	0,43	0,87
Relomycin	0,63	1,0

^aPapier: Whatman No. 1 mit 0,75-molarem KH_2PO_4 -Puffer vom pH 4,0 behandelt und getrocknet

^bLösungsmittel: D = mit Wasser gesättigtes Ethylacetat
E = mit Wasser gesättigtes n-Butanol

B e i s p i e l 3Herstellung von OMT

Das nach Beispiel 2 hergestellte DMT wird in verdünnter Chlorwasserstoffsäurelösung gelöst (Zugabe von HCl zu Wasser, bis die Lösung einen pH-Wert von 1,8 hat). Die erhaltene Lösung wird 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann durch Zusatz von Natriumhydroxid auf pH 9,0 eingestellt. Die basische Lösung wird mit Ethylacetat, Dichlormethan oder Chloroform extrahiert. Der Extrakt wird unter Vakuum getrocknet, wodurch man zu OMT gelangt.

B e i s p i e l 4

Herstellung von OMT

Das nach Beispiel 2 hergestellte DMT (500 g) wird mit einem Mörser und einem Pistill vermahlen und zu deionisiertem Wasser (1,5 l) gegeben. Der pH-Wert wird durch bedarfsweisen Zusatz von Schwefelsäure (20 %-ig) zwischen 3,5 und 7,5 gehalten. Nach 30 Minuten ist das gesamte DMT in Lösung gegangen. Sodann stellt man den pH-Wert der Lösung auf etwa 1,4 ein und läßt die Lösung 42 Stunden bei 22°C stehen. Nach üblicher Aufarbeitung gelangt man zu 366 g OMT, dessen Identität durch Vergleich seines Dünnschichtchromatogramms mit einer bekannten authentischen Probe bestätigt wird, die man unter Anwendung des in US-PS 3 459 853 beschriebenen Verfahrens erhält.

B e i s p i e l 5

Herstellung von Dihydro-DMT

Man löst das nach Beispiel 2 hergestellte DMT (50 mg) in einer wäßrigen Isopropylalkohollösung (etwa 40 %, 25 ml). In einer 30 %-igen wäßrigen Isopropylalkohollösung (10 ml) löst man Natriumborhydrid (20 mg). Die Natriumborhydridlösung (1 ml) wird dann zur DMT-haltigen Lösung gegeben. Das erhaltene Gemisch wird 5 Minuten gerührt, mit Phosphorsäure auf pH 7,5 eingestellt und dann zur Entfernung des Isopropylalkohols unter Vakuum konzentriert. Das Konzentrat wird mit Chloroform (50 ml) versetzt. Der pH-Wert der wäßrigen Schicht wird auf 7,5 eingestellt. Nach Extraktion wird das Chloroform abgetrennt und unter Vakuum zur Trockne eingedampft, wodurch man zu Dihydro-DMT gelangt.

B e i s p i e l 6

Herstellung von Dihydro-OMT

Das nach Beispiel 5 hergestellte Dihydro-DMT wird genauso behandelt wie bei Beispiel 3, wodurch man Dihydro-OMT erhält.

B e i s p i e l 7

Anderes Verfahren zur Herstellung von OMT

Zur Herstellung von OMT aus DMT behandelt man DMT in der Fermentationsbrühe, in der es gebildet wird, mit einer schwachen Säure nach dem in Beispiel 3 beschriebenen Verfahren. Die Isolierung von OMT erfolgt nach einem ähnlichen Verfahren wie für DMT bei Beispiel 2.

B e i s p i e l 8

2'-O-Acetyl-DMT

Man löst DMT (10 g, 13,5 mMol) in Aceton (260 ml) und behandelt die Lösung unter Rühren bei Raumtemperatur tropfenweise mit Essigsäureanhydrid (1,6 ml, 15,7 mMol). Die Lösung wird über Nacht (18 Stunden) weiter gerührt und das Lösungsmittel dann unter verringertem Druck entfernt. Der Rückstand wird in Ethylacetat (200 ml) gelöst und die Lösung mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung (2 x 200 ml) extrahiert. Die organische Lösung wird getrocknet (Natriumsulfat), filtriert und eingedampft. Der Rückstand wird in einem kleinen Volumen Ethylacetat gelöst, worauf man die Lösung auf eine Silicagelsäule (Waters Prep 500) aufgibt und die Säule mit

Ethylacetat (4 l) eluiert. Die das gewünschte Produkt enthaltenden Fraktionen werden durch dünnschichtchromatographische Analyse identifiziert, vereinigt und zur Trockne eingedampft, wodurch man zu 6,5 g (61 %) 2'-O-Acetyl-DMT gelangt.

B e i s p i e l 9

2'-O-Propionyl-DMT

In analoger Weise behandelt man DMT (6,0 g, 8,1 mMol) in Aceton (120 ml) mit Propionsäureanhydrid (1,2 ml, 9,2 mMol). Nach Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung gelangt man zu 3,7 g (57 %) 2'-O-Propionyl-DMT.

B e i s p i e l 10

2',23-Di-O-acetyl-DMT

Man löst DMT (3 g, 4,05 mMol) in Methylenchlorid (90 ml) und Pyridin (7,8 ml) und behandelt die Lösung unter Rühren bei Raumtemperatur tropfenweise mit 1,4 ml (13,7 mMol) Essigsäureanhydrid. Die Lösung wird über Nacht (17 Stunden) gerührt, worauf man sie mit Toluol (15 ml) verdünnt und zur Entfernung der Lösungsmittel unter verringertem Druck eindampft. Der Rückstand wird in einem kleinen Volumen Ethylacetat gelöst, worauf man die Lösung auf eine Silicagelsäule (Waters Prep 500) aufgibt und die Säule mit Ethylacetat (4 l) eluiert. Auf diese Weise gelangt man zu 2,1 g eines Rohprodukts. Dieses Material wird in einem minimalen Volumen Toluol gelöst. Die Lösung wird auf eine Schnellchromatographiesäule aus Silicagel (300 ml) aufgegeben und die Säule mit (a) einem 3:1-Gemisch aus Toluol und Ethylacetat (300 ml), (b) einem 5:4-Gemisch aus Toluol und Ethylacetat (600 ml) und (c) einem

1:1-Gemisch aus Toluol und Ethylacetat (1000 ml) eluiert. Die das gewünschte Produkt enthaltenden Fraktionen werden durch dünnschichtchromatographische Analyse lokalisiert, vereinigt und zur Trockne eingedampft, wodurch man 1,7 g (64 %) 2',23-Di-O-acetyl-DMT erhält.

B e i s p i e l 11

2',23-Di-O-propionyl-DMT

Man löst DMT (3 g, 4,05 mMol) in Methylenchlorid (90 ml) und Pyridin (7,8 ml) und behandelt die Lösung dann unter Rühren bei Raumtemperatur tropfenweise mit 1,8 ml (13,8 mMol) Propionsäureanhydrid. Die Lösung wird über Nacht gerührt, worauf man sie mit Toluol (15 ml) versetzt und unter verringertem Druck zur Trockne eindampft. Der Rückstand wird in Toluol (20 ml) gelöst, worauf man die Lösung auf eine mit Silicagel (E. Merck 60, 300 ml) gefüllte Schnellchromatographiersäule gibt und die Säule mit (a) einem 3:1-Gemisch aus Toluol und Ethylacetat (300 ml), (b) einem 5:4-Gemisch aus Toluol und Ethylacetat (300 ml) und (c) einem 1:1-Gemisch aus Toluol und Ethylacetat (1000 ml) eluiert. Auf diese Weise gelangt man zu 2,5 g (72 %) 2',23-Di-O-propionyl-DMT.

B e i s p i e l 12

2'-O-Acetyl-23-O-propionyl-DMT

Man löst 2'-O-Acetyl-DMT (6 g, 7,7 mMol) in Methylenchlorid (180 ml) und Pyridin (15 ml) und behandelt die erhaltene Lösung unter Rühren bei Raumtemperatur dann tropfenweise mit 1,2 ml (9,2 mMol) Propionsäureanhydrid. Die Lösung wird über Nacht (17 Stunden) gerührt, worauf man sie mit Toluol (300 ml) verdünnt und unter vermindertem Druck zur Trockne ein-

dampft. Der Rückstand wird in Toluol gelöst und die Lösung mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung extrahiert. Die Toluolschicht wird getrocknet (Natriumsulfat), filtriert und eingedampft. Der Rückstand wird in einem kleinen Volumen Toluol gelöst, worauf man die Lösung auf eine mit Silicagel (300 ml) in einem 1:1-Gemisch aus Toluol und Ethylacetat gefüllte Schnellchromatographiersäule gibt und die Säule mit einem 1:1-Gemisch aus Toluol und Ethylacetat (1 l) eluiert. Die das gewünschte Produkt enthaltenden Fraktionen werden dünnschichtchromatographisch identifiziert, vereinigt und unter verringertem Druck eingedampft, wodurch man zu 4,5 g (70 %) 2'-O-Acetyl-23-O-propionyl-DMT gelangt.

B e i s p i e l 13

2'-O-Propionyl-23-O-acetyl-DMT

In ähnlicher Weise behandelt man auch 2'-O-Propionyl-DMT (1,5 g, 2 mMol) in Methylenchlorid (45 ml) und Pyridin (3,9 ml) mit 0,3 ml (2,9 mMol) Essigsäureanhydrid. Nach chromatographischer Reinigung über Silicagel (Waters Prep 500) erhält man 0,81 g (51 %) 2'-O-Propionyl-23-O-acetyl-DMT.

B e i s p i e l 14

2'-O-Acetyl-23-O-phenylacetyl-DMT

Man löst 2'-O-Acetyl-DMT (2,75 g, 3,5 mMol) in Methylenchlorid (75 ml) und Pyridin (0,8 ml) und behandelt die Lösung unter Rühren bei Raumtemperatur dann tropfenweise mit einer Lösung von 0,56 ml (3,5 mMol) Phenylacetylchlorid in Methylenchlorid (13 ml). Das Ganze wird 1,5 Stunden gerührt und dann mit weiterem Phenylacetylchlorid (0,56 ml) in Methylenchlorid (13 ml) behandelt. Nach weiteren 1,5 Stunden ist das Aus-

gangsmaterial verbraucht, wie sich durch dünnschichtchromatographische Analyse zeigt. Die Lösung wird dann unter verringertem Druck zur Trockne eingedampft, worauf man den Rückstand in Methylenchlorid löst und die Lösung mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung extrahiert. Die organische Schicht wird getrocknet (Natriumsulfat), filtriert und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in Toluol gelöst und die Lösung über eine Silicagelsäule (Waters Prep 500) chromatographiert. Die Eluierung wird mit einem linearen Gradienten aus einem 1:1-Gemisch aus Toluol und Ethylacetat (4 l) und aus Ethylacetat (4 l) durchgeführt. Die das gewünschte Produkt enthaltenden Fraktionen werden eingedampft, wodurch man 1,1 g (35 %) 2'-O-Acetyl-23-O-phenylacetyl-DMT erhält. Aus den früheren Fraktionen gelangt man zu weiteren 0,86 g (24 %) 2'-O-Acetyl-23,4''-di-O-phenylacetyl-DMT.

B e i s p i e l 15

23-O-Propionyl-DMT

Man löst 2'-O-Acetyl-23-O-propionyl-DMT (1,6 g, 1,9 mMol) in 95 %-igem Methanol (80 ml) und rührt die Lösung 42 Stunden bei Raumtemperatur. Die Lösung wird dann unter verringertem Druck zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in einem geringen Volumen Toluol gelöst, worauf man die Lösung auf eine mit Silicagel (E. Merck 60, 200 ml) gefüllte Schnellchromatographiersäule gibt und die Säule mit einem 1:1-Gemisch aus Toluol und Ethylacetat (2 l) eluiert. Die das gewünschte Produkt enthaltenden Fraktionen werden durch dünnschichtchromatographische Analyse identifiziert, vereinigt und unter verringertem Druck eingedampft, wodurch man zu 1,2 g (79 %) 23-O-Propionyl-DMT gelangt.

B e i s p i e l 16

23-O-Phenylacetyl-DMT

Man löst 2'-O-Acetyl-23-O-phenylacetyl-DMT (0,6 g, 0,67 mMol) in 80 %-igem wäßrigem Methanol (50 ml) und erhitzt die Lösung 4,5 Stunden leicht auf Rückflußtemperatur. Die Lösung wird dann auf Raumtemperatur abgekühlt und unter verringertem Druck zur Trockne eingedampft, wodurch man 0,39 g (68 %) 23-O-Phenylacetyl-DMT erhält.

B e i s p i e l 17

23,4''-Di-O-phenylacetyl-DMT

Man löst 2'-O-Acetyl-23,4''-di-O-phenylacetyl-DMT (0,36 g, 0,36 mMol) in 80 %-igem wäßrigem Methanol (30 ml) und erhitzt die Lösung 4,5 Stunden auf Rückflußtemperatur. Die Lösung wird dann auf Raumtemperatur abgekühlt und unter verringertem Druck zur Trockne eingedampft, wodurch man zu 0,29 g (84 %) 23,4''-Di-O-phenylacetyl-DMT gelangt.

B e i s p i e l 18

2'-O-Acetyl-3,23,4''-tri-O-propionyl-DMT

Man löst 2'-O-Acetyl-DMT (2 g, 2,6 mMol) in Aceton (40 ml) und Pyridin (8 ml) und behandelt die Lösung unter Rühren bei Raumtemperatur tropfenweise mit einer Lösung von 40 ml Propionsäureanhydrid in Aceton (20 ml). Man rührt insgesamt 5 Tage und dampft das Gemisch dann unter verringertem Druck ein. Das zurückbleibende Öl wird in Ethylacetat gelöst und die Lösung mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung extrahiert.

Die organische Schicht wird getrocknet (Natriumsulfat), filtriert und eingedampft. Der Rückstand wird in einem geringen Volumen Toluol gelöst und die Lösung über Silicagel (Waters Prep 500) chromatographiert. Die Säule wird mit einem linearen Gradienten aus Toluol (4 l) und Ethylacetat (4 l) eluiert. Die das gewünschte Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und eingedampft, wodurch man zu 1,4 g (57 %) 2'-O-Acetyl-3,23,4''-tri-O-propionyl-DMT gelangt.

B e i s p i e l 19

3,23,4''-Tri-O-propionyl-DMT

Man löst 2'-O-Acetyl-3,23,4''-tri-O-propionyl-DMT (0,7 g, 0,74 mMol) in 80 %-igem wäßrigem Methanol (55 ml) und erhitzt die erhaltene Lösung 5 Stunden auf Rückflußtemperatur. Sodann wird die Lösung abgekühlt und anschließend unter verringertem Druck zur Trockne eingedampft. Das dabei erhaltene Produkt wird in Methylenchlorid extrahiert. Die organische Schicht wird abgetrennt, getrocknet (Natriumsulfat), filtriert und unter verringertem Druck zur Trockne eingedampft, wodurch man zu 0,38 g (56 %) 3,23,4''-Tri-O-propionyl-DMT gelangt.

B e i s p i e l 20

2',4'',23-Tri-O-acetyl-DMT

Man löst DMT (10,0 g, 13,5 mMol) in Pyridin (150 ml) und behandelt die erhaltene Lösung dann unter Rühren bei Raumtemperatur mit 5,8 ml (60,7 mMol) Essigsäureanhydrid. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht gerührt und anschließend zur Entfernung des Lösungsmittels unter verringertem Druck eingedampft.

Das zurückbleibende Öl wird in Dichlormethan gelöst, worauf man den Extrakt mit Natriumbicarbonatlösung sättigt, die organische Schicht abtrennt, trocknet (Natriumsulfat), filtriert und unter verringertem Druck eindampft. Das hierbei zurückbleibende Material wird über eine mit Silicagel (Waters Prep 500) gefüllte Säule chromatographiert, wobei man die Säule mit einem linearen Gradienten eines 3:1-Gemisches aus Toluol und Ethylacetat (4 l) sowie mit Ethylacetat (4 l) eluiert. Die das gewünschte Produkt enthaltenden Fraktionen werden dünnschichtchromatographisch identifiziert, vereinigt und unter verringertem Druck eingedampft, wodurch man zu 4,5 g 2',4'',23-Tri-O-acetyl-DMT gelangt.

B e i s p i e l 21

2'-O-Acetyl-23-O-phenoxyacetyl-DMT

Man löst 2'-O-Acetyl-DMT (2,75 g, 3,5 mMol) in Dichlormethan (75 ml) und Pyridin (0,8 ml) und behandelt das Ganze unter Rühren bei Raumtemperatur tropfenweise mit einer Lösung von 1,2 ml (8,8 mMol) Phenoxyacetylchlorid in Dichlormethan (25 ml). Nach 1 Stunde gießt man das Reaktionsgemisch in eine gesättigte Natriumbicarbonatlösung (200 ml), worauf man die organische Schicht abtrennt, trocknet (Natriumsulfat), filtriert und unter verringertem Druck eindampft. Der zurückbleibende feste Schaum wird auf eine mit Silicagel gefüllte Schnellchromatographiersäule gegeben, und die Produkte werden abgetrennt und unter Verwendung eines 1:1-Gemisches aus Toluol und Ethylacetat als Lösungsmittel eluiert. Auf diese Weise gelangt man zu 1,5 g 2'-O-Acetyl-23-O-phenoxyacetyl-DMT zusammen mit 0,55 g 2'-O-Acetyl-23,4''-di-O-phenoxyacetyl-DMT und 0,03 g 2'-O-Acetyl-3,23-di-O-phenoxyacetyl-DMT.

B e i s p i e l 22

2'-O-Acetyl-23-O-(p-chlorphenylacetyl)-DMT

Man löst p-Chlorphenylessigsäure (4,3 g, 25 mMol) und 1-Hydroxybenzotriazol (3,4 g, 25 mMol) in Tetrahydrofuran (150 ml). Die Lösung wird in einem Eisbad gekühlt und mit Dicyclohexylcarbodiimid (5,2 g, 25,3 mMol) behandelt. Das Reaktionsgemisch wird 3 Stunden bei 0°C gerührt und dann über Nacht in einen Kühlschrank gestellt. Das Gemisch wird filtriert und das Filtrat unter verringertem Druck eingedampft. Der Rückstand wird in Aceton (75 ml) gelöst, worauf man die Lösung filtriert und mit 10 g (12,8 mMol) 2'-O-Acetyl-DMT und 0,87 g (12,8 mMol) Imidazol behandelt. Durch Zusatz von Aceton wird die Lösung auf ein Volumen von insgesamt 125 ml gebracht und dann mit 1,87 ml (12,8 mMol) Triethylamin versetzt. Die Lösung wird 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, worauf man das Lösungsmittel unter verringertem Druck verdampft. Der Rückstand wird auf eine mit Silicagel gefüllte Schnellchromatographiersäule gegeben und die Säule unter Anwendung eines Gradienten mit einem 4:1-Gemisch aus Toluol und Ethylacetat bis zu Ethylacetat allein eluiert. Auf diese Weise gelangt man zu 4,75 g 2'-O-Acetyl-23-O-(p-chlorphenylacetyl)-DMT.

B e i s p i e l 23

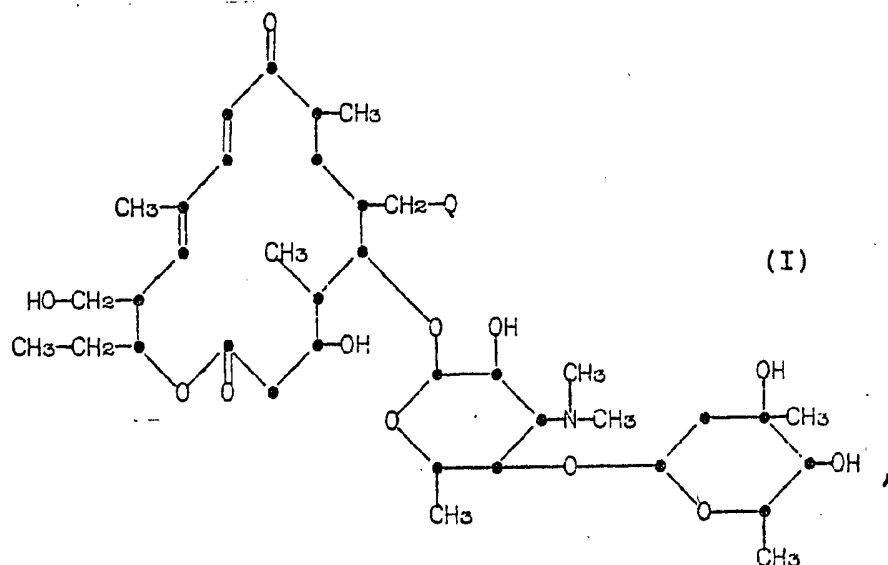
2'-O-Acetyl-4''-O-propionyl-DMOT

Man löst 2'-O-Acetyl-DMOT (1,0 g, 1,3 mMol) in Pyridin (30 ml) und behandelt die erhaltene Lösung unter Rühren bei Raumtemperatur tropfenweise mit 0,6 ml (4,6 mMol) Propionsäureanhydrid. Nach 20 Stunden gibt man weitere 3,0 ml (23 mMol) Propionsäureanhydrid zu und rührt die erhaltene Lösung 26 Stun-

den bei Raumtemperatur weiter. Das Gemisch wird mit Toluol (30 ml) verdünnt, und die Lösungsmittel werden unter verringertem Druck verdampft. Das zurückbleibende Öl wird in Dichlormethan (50 ml) gelöst, worauf man die Lösung mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung extrahiert, die organische Schicht abtrennt, trocknet (Natriumsulfat), filtriert und eindampft. Der Rückstand wird auf eine mit Silicagel (Waters Prep 500) gefüllte Säule gegeben und die Säule mit einem linearen Gradienten aus Toluol (4 l) und Ethylacetat (4 l) eluiert. Zuerst werden 305 mg 2'-O-Acetyl-3,4''-di-O-propionyl-DMOT und anschließend 286 mg 2'-O-Acetyl-4''-O-propionyl-DMOT eluiert.

Erfindungsansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Makrolids der allgemeinen Formel (I)



worin Q für $-\text{CH}_2\text{OH}$ oder $-\text{CHO}$ steht, oder eines Acylesters hiervon, oder von Säureadditionssalzen der obigen Verbindungen oder Estern hiervon,

mit der Maßgabe, daß dann, falls die Stellung 3 des Moleküls von einer O-Acetylgruppe besetzt ist, die Stellung 4'' keine O-Isovalerylgruppe enthalten kann,

dadurch gekennzeichnet, daß man

- (a) *Streptomyces fradiae* NRRL 12170 unter submersen aeroben Bedingungen bis zur Bildung einer wesentlichen antibiotischen Aktivität und Erzeugung des gewünschten Makrolids züchtet oder

230761 4

- 51 -

- (b) 23-Demycinosyltylosin mit einem chemischen Reduktionsmittel unter Bildung des Makrolids, worin Q für $-\text{CH}_2\text{OH}$ steht, reduziert und
- (c) durch Ansäuerung oder Veresterung gewünschtenfalls ein Salz oder einen entsprechenden Ester bildet.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß man 23-Demycinosyltylosin herstellt.
3. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß man 20-Dihydro-23-demycinosyltylosin herstellt.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

230761 4

52

