

(19)



SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 812065 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 812065

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12P 17/08
C12R 1/54

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 01.07.1981

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 01.07.1981

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 03.01.1982

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

02.07.1980 US 162,977

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Eli Lilly and Company, 307 East McCarty Street, Indianapolis, Ind. 46206, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Baltz, Richard Henry, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Seno, Eugene, Thomas, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

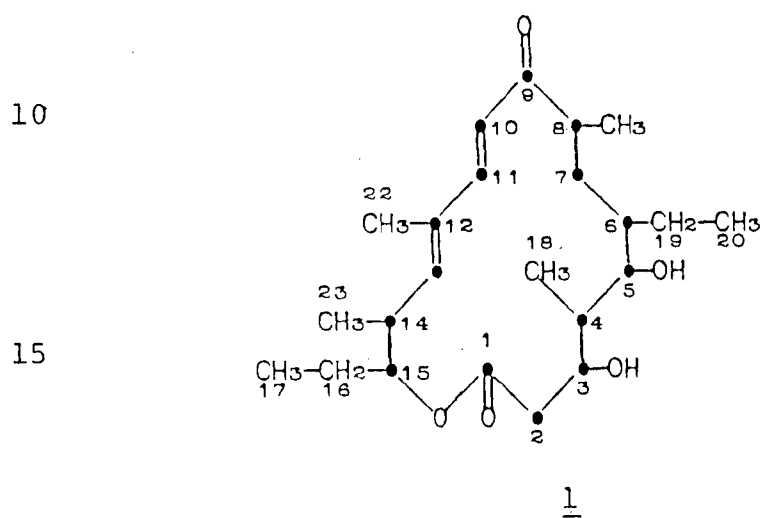
(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä makrolidin valmistamiseksi.

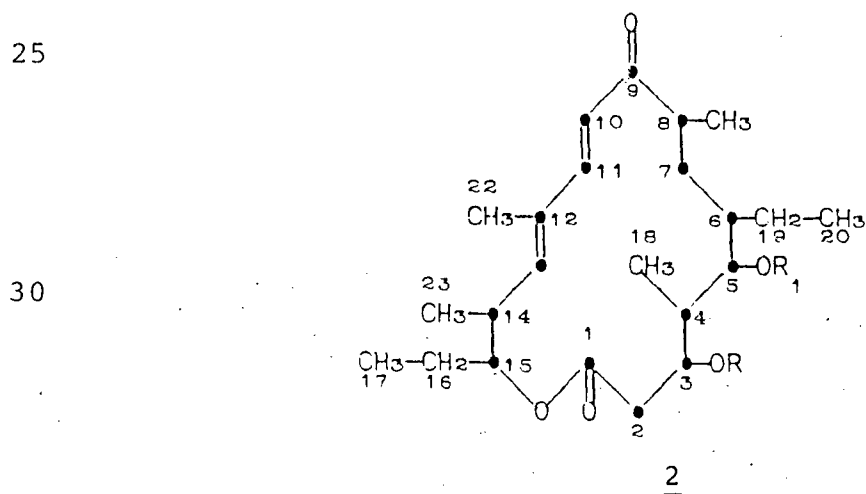
Förfarande för framställning av makrolid.

Menetelmä makrolidin valmistamiseksi

Tämä keksintö koskee menetelmää, jolla valmistetaan makrolidia 20-dihydro-20,23-dideoksitylonolidi, josta seuraavassa käytetään mukavuussyistä nimitystä tylaktoni. Tylaktonin rakennekaava 1 on:



20 Se on käyttökelpoinen valmistettaessa sitä lähellä olevia asyyli johdannaisia, joiden rakennekaava 2 on:



jossa R ja R_1 = asyyliiryhmä.

Rakennekaavoje 1 ja 2 mukaiset yhdisteet ovat käyttökelpoisia väliyhdisteitä, joista voidaan valmistaa 16-jäsenisisä makrolidi-antibiootteja. Vaikka-
 5 kaan mitään stereokemiallisia merkkejä ei esiinny tässä esitetyissä rakennekaavoissa, yhdisteiden stereokemia on identtinen tylosiin stereokemian kanssa.

Tylaktonin 3- ja 5-hydroksyyliiryhmät voidaan esteröidä, jolloin saadaan asyyliesterijohdannaisia käsittelemällä yhdistettä asylointiaineiden kanssa alan tunnettuja menetelmiä käyttäen. Tylaktonin asyyliesterijohdannaiset ovat käyttökelpoisia väliyhdisteinä valmistettaessa uusia makrolidi-antibiootteja.

Tyypillisiä asylointiaineita ovat orgaanisten
 15 happojen anhydritit, haloidit (tavallisesti emäksen tai muun happoa neutraloivan aineen yhteydessä) ja aktiiviset esterit. Asylointi voidaan suorittaa myös käyttämällä orgaanisen hapon ja vettä poistavan aineen kuten N,N'-disykloheksyylikarbodiimidin seosta. Asylointeja
 20 voidaan suorittaa myös entsymaattisesti käyttämällä esimerkiksi sellaisia menetelmiä, joita ovat selostaneet Okamoto ym., US-patentissa 4 092 473. Muodostuttuaan asyylijohdannaiset voidaan eristää ja puhdistaa tunnetuin menetelmin.

Johdannaisia voidaan valmistaa alalla yleisesti tunnetuin esteröintimenetelmin, kuten, esimerkiksi, käsittelemällä yhdistettä stökiömetrisen (tai hiukan sitä suuremman) määränkansaa asylointiainetta, kuten asyylianhydridin kanssa, orgaanisessa liuottimessa
 30 (esimerkiksi pyridiinissä) noin $0^{\circ}\text{C}:\text{n}$ - noin huoneen lämpötilan välillä olevassa lämpötilassa noin 1 - noin 24 tunnin ajan kunnes esteröityminen on pääasiallisesti tapahtunut täydellisesti.

Esterijohdannainen voidaan eristää reaktioseoksesta tavallisin menetelmin kuten uuttamalla, kromatogra-

fioimalla ja kiteyttämällä.

Käyttökelpoisia estereitä ovat orgaanisten happojen mukaan luettuina 1-18-hiiliatomisten alifaattisten, sykloalifaattisten, aryyli-, aralkyyli-, hetero-
 5 syklisten karboksyyli-, sulfoni- ja alkoksikarbonihappojen, ja epäorgaanisten happojen, kuten rikkihapon ja fosforihapon esterit.

Esimerkkejä sopivista estereistä ovat esterit, jotka ovat selllaisten happojen kuten muurahaishapon, etikkahapon, kloorietikkahapon, propionihapon, voiha-
 10 ppon, isovaleriaanahapon, glukuronihapon, alkoksikarbonihapon, steariinihapon, syklopropanikarboksyylihapon, sykloheksaanikarboksyylihapon, β -sykloheksyylipropionihapon, 1-adamantaanikarboksyylihapon, bensoehapon,
 15 fenyylietikkahapon, fenoksietikkahapon, mantelihapon ja 2-tienyylietikkahapon, ja alkyyli- aryyli- ja aralkyyli-sulfonihappojen, joiden aryyli- ja aralkyylihappojen aromaattisessa osassa on valinnaisesti sellaisia substituentteja kuten halogeeni, nitro, pienalkoksi ja
 20 näiden kaltaisia substituentteja, johdannaisia. Sopivia estereitä ovat myös puoliesterit, jotka ovat dikarboksyylihappojen kuten meripihkahapon, maleiinihapon, fumaarihapon, malonihapon ja ftaalihapon johdannaisia.

Tylaktonia voidaan valmistaa viljelemällä
 25 *Streptomyces fradiae*-lajia, joka tuottaa tätä yhdistettä pinnanalaisissa aerobisissa olosuhteissa sopivassa elatusaineessa kunnes haluttua yhdistettä on muodostunut riittävä määrä.

Streptomyces fradiae'n kasvattamiseen käytettävä elatusaine voi olla mikä tahansa lukuisista elatusaineista. Tuotannon taloudellisuuden, edullisimman saannon ja tuotteen eristämisen helppouden kannalta tietyt elatusaineet ovat, kuitenkin, ensisijaisia. Täten, esimerkiksi, ensisijaisia hiililähteitä suurimittakaavais-
 35 sessä käymisprosessissa ovat hiilihydraatit kuten

dekstriini, glukoosi, tärkkelys, ja maissijauho ja öljyt kuten soijapapuöljy. Ensimmäisiä tyypilähteitä ovat maissijauho, soijapapujauho, kalajauhe, aminohapot ja näiden kaltaiset aineet. Ravitsevista epäorgaanisista suoloista, joita voidaan sekoittaa elatusaineisiin, ovat tavanomaiset liukenevat suolat, jotka pystyvät tuottamaan rauta-, kalium-, natrium-, magnesium-, kal-

10 Elatusaineeseen on sisällytettävä myös oleellisia hivenalkuaineita, jotka ovat välttämättömiä organismin kasvun ja kehittymisen kannalta. Sellaisia hivenalkuaineita esiintyy yleisesti epäpuhtauksina muissa elatusaineiden aineksissa riittävin määrin tyydyttämään
15 organismin kasvun edellytykset. Jos kuohuminen tuottaa huolia voi olla välttämättöntä, että suurimittakaavaisen käymisen yhteydessä elatusaineeseen lisätään pieniä määriä (s.o. 0,2 ml/l) vaahtoamista estävää ainetta kuten esim. polypropyleeniglykolia (molekyyllipaino
20 noin 2000).

Huomattavien tylaktoni-määrien valmistamiseen suositellaan käymisreaktion suorittamista pinnan-alaisena aerobisena käymisenä altaissa. Pieniä tylaktonimääriä voidaan saada ravistuspullo-viljelmänä. Johtuen valmistuksen hitaudesta, jota esiintyy yleisesti istutettaessa suuriin altaisiin organismin itiömuotoa, suositellaankäytettäväksi vegetatiivista istutetta. Vegetatiivista istutetta valmistetaan istuttamalla pieneen tilavuusmäärään elatusainetta organismin itiömuotoa
30 tai huovastopaliasia, jolloin saadaan organismin tuotetta, aktiivisesti lisääntyvää viljelmää. Vegetatiivinen istute siirrefään sitten suurempaan altaaseen. Vegetatiiviseen istutukseen käytettävä elatusaine voi olla samaa, jota käytetään suuremmissa altaissa tapahtuvaan
35 käyttämiseen, joskin muitakin elatusaineita voidaan käyttää.

Tämän keksinnön menetelmä on tunnettu siitä, että siinä viljellään uutta mikro-organismia, jota on saatu tylosiinia tuottavan *Streptomyces fradiae*-lajin kemiallisen muunnoksen avulla. Uusi mikro-organismi tuottaa ai-
 5 noastaan minimaalisia määriä tylosiinia, mutta tuottaa pääkomponenttina tylaktonia.

Tämä keksintö koskee myös uutta tylakotnia tuottavaa mikro-organismia. Uusi mikro-organismi on luokiteltavissa myös *Streptomyces fradiae*-lajina. Tämän mikro-
 10 organismin viljelmää on talletettu ja liitetty osana varastoviljelmäkokoelmaan laitoksessa Northern Regional Research Center, Agricultural Research, North Central Region, 1815 North University Street, Peoria, Illinois, 61604, josta sitä on yleisön saatavissa liitännänume-
 15 rolla NRRL 12188.

Kuten on asian laita muidenkin organismien yhteydessä, *Streptomyces fradiae* NRRL 12188:n ominaispiirteet ovat alttiit muunnoksille. Esimerkiksi NRRL 12188-lajin rekombinaatioita, mutantteja tai variantteja voidaan
 20 saada käsittelemällä sitä erilaisilla tunnetuilla fyysikaalisilla ja kemiallisilla mutageeneilla, kuten ultraviolettivalolla, röntgensäteillä, gammasäteillä, ja N-metyyli-N'-nitro-N-nitrosoguanidiinilla. Kaikki *Streptomyces fradiae* NRRL 12188:n luonnolliset ja indusoidut
 25 variantit, mutantit ja rekombinaatiot, jotka säilyttävät tylaktoni-tuotannon ominaispiirteet, muodostavat osat tästä keksinnöstä.

Lajia *S. fradiae* NRRL 12188 voidaan kasvattaa lämpötilojen ollessa välillä noin 10° - noin 40°C. Tylaktonia näyttää muodostuvan edullisimmin lämpötilojen
 30 ollessa suunnilleen 28°C.

Kuten aerobisten pinnanalaisten viljelymenetelmien yhteydessä on yleistä, steriilin ilman annetaan kuplia elatusaineen läpi. Jotta antibiootin muodostuminen on tehokasta, allastuotannossa ilman kyllästysprosentin tulisi ollanoin 30 % tai suurempi (28°C:ssa ja yhden ilmakehän paineessa).

Tylaktonin muodostumista voidaan seurata käymisen aikana koestamalla elatusainenäytteitä, käyttämällä suuritehoista nestekromatografiaa UV-ilmaisina systeemin kanssa [katso, esimerkiksi, J.H. Kennedy, J.Chromatographic Science, 16, 492-495 (1978)].

Pinnanalaisissa aerobisissa käymisolosuhteissa muodostumisensa jälkeen tylaktoni voidaan ottaa talteen elatusaineesta käymisalalla käytetyin menetelmin. Koska tylaktonin liukoisuus veteen on rajoittunutta, se ei ehkä liukene kokonaisuudessaan elatusaineeseen, jossa sitä tuotetaan. Tylaktonin talteenotto voidaan, tästä johtuen, suorittaa 1) uuttamalla käymisliemi tai 2) suodattamalla käymisliemi jauuttamalla sekä suodatettu liemi että huovastokakku. Uutosprosesseissa voidaan käyttää erilaisia menetelmiä. Ensisijaisena suodatetun käymisliemen puhdistusmenetelmänä on liemen uuttaminen (tavallisesti pH:ta säätämättä) sopivalla liuottimella kuten amyyliaasetatilla tai petrolieetterillä, orgaanisen faasin konsentroiminen vakuumissa, jolloin saadaan kiteitä tai öljyä. Jos saadaan öljyä, se voidaan puhdistaa adsorptiokromatografiaa käyttäen.

Rakennekaavojen 1 ja 2 mukaiset yhdisteet ovat käyttökelpoisia väliyhdisteinä, joista voidaan valmistaa makrolidi-antibiootteja. Esimerkiksi tylaktoni (1) voidaan biokonvertoida tylosiiniksi lisäämällä se biokonvertoivan mikro-organismin kasvuviljelmään. Biokonvertoiva mikro-organismi voi olla *Streptomyces fradiae*-lajia, joka joko tuottaa itse tylosiinia tai pystyy tuottamaan tylosiinia, paitsi että se on suojattuna tylaktonin muodostuksessa.

Lajia, joka pystyy tuottamaan tylosiinia, paitsi että se on suojattuna tylaktonin muodostuksessa, voidaan saada käsittelemällä tylosiinia tuottavaa lajia matageenilla ja seulomalla elävät organismit eroon niistä, jotka eivät pysty tuottamaan tylosiinia. Elävät

organismit, jotka eivät pysty tuottamaan tylosiinia, seulotaan edelleen jotta saataisiin määritetyksi, mitkä lajit eivät pysty myöskään tuottamaan tylaktonia. Nämä lajit identifioidaan lisäämällä valittuja eläviä organismeja sisältäviin pieniin ravistuspullo-viljelmiin tylaktonia jotta saataisiin määritetyksi pystyvätkö ne tuottamaan tylosiinia.

Streptomyces fradiae-lajit NRRL 2702 ja NRRL 2703 ovat esimerkkejä Streptomyces-lajeista, jotka pystyvät tuottamaan tylosiinia. Tyypillinen mutageeni, jota voidaan käyttää valittujen lajien saamiseksi, on N-metyyli-N'-nitro-nitrosoguanidiini.

Rakennevaan 1 mukainen yhdiste on erityisen käyttökelpoinen valmistettaessa merkittyjä yhdisteitä aineenvaihtotutkimuksia varten. Merkitsemällä joko tylaktoni-osa tai lisätyt sekoeriryhmät, tylosiinin aineenvaihdunnallinen kulkutie voidaan saada selville.

Tämän keksinnön menetelmän valaistamiseksi täydellisemmin esitetään seuraavat esimerkit:

20 Esimerkki 1

A. Tylaktonin ravistuspullo-käyminen

Streptomyces fradiae NRRL 12188:n kylmäkuivattu rae dispergoitiin 1-2 ml:aan steriloitua vettä. Osaa tästä liuoksesta (0,5 ml) käytettiin vegetatiivisen elastusaineen (150 ml) istuttamiseen, jonka koostumus oli seuraava:

	<u>Aineosa</u>	<u>Määrä (%)</u>
	Maissiliotusneste	1,0
	Hiivauute	0,5
30	Soijapapu-rouhe	0,5
	CaCO ₃	0,3
	Soijapapuöljy (raakaa)	0,45
	Deionoitu vesi	97,25

Vaihtoehtoisena menetelmänä S. fradiae NRRL 12122:n vegetatiivista viljelmää, jota oli säilytetty, 1 ml:n tilavuisena, nestemäisessä työssä, sulatettiin nopeasti

ja sitä käytettiin vegetatiivisen elatusaineen istuttamiseen. Istutettua vegetatiivista elatusainetta haudottiin 500 ml:n Erlenmeyer-pullossa 29°C:ssa noin 48 tuntia suljetussa täristimessä nopeuden ollessa noin 300 kierr./min.

- 5 Tätä haudottua vegetatiivista elatusainetta (0,5 ml) käytettiin 7 ml:n tuotanto-elatusaine-erän istuttamiseen, jonka koostumus oli seuraava:

	<u>Aineosa</u>	<u>Määrä (%)</u>
	Juurikasmelassi	2,0
10	Maissijauho	1,5
	Kalajauhe	0,9
	Maissigluteeni	0,9
	NaCl	0,1
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,04
15	CaCO ₃	0,2
	Soijapapuöljy (raakaa)	3,0
	Deionoitu vesi	91,36

- Istutettua käymiselatusainetta haudottiin 50 ml:n pullossa 29°C:ssa 6 päivää suljetussa täristimessä nopeuden ollessa 300 kierr./min.

B. Tylaktonin allas-käyminen

- Suuremman istutetilavuuserän saamiseksi 60 ml haudottua vegetatiivista elatusainetta, jota oli valmistettu samalla tavalla kuin on selostettu osassa A, 25 käytettiin 38 litran suuruisen toisen vaiheen vegetatiivisen kasvuelatusaine-erän istuttamiseen, jonka koostumus oli seuraava:

	<u>Aineosa</u>	<u>Määrä (%)</u>
	Maissiliotusneste	1,0
30	Soijapapujauho	0,5
	Hiivauute	0,5
	CaCO ₃	0,3
	Soijapapuöljy (raakaa)	0,5
	Lesitiini (raakaa)	0,015
35	Vesi	97,185

pH säädettiin arvoon 8,5 50-%:sella NaOH-liuoksella.

Tätä toisen vaiheen vegetatiivista elatusainetta haudottiin 68 litran altaassa noin 47 tuntia 29°C:ssa.

5 Näin valmistettua toisen vaiheen elatusainetta (4 litraa) käytettiin 40 litran steriilin tuotantoelatusaine-erän istuttamiseen, jonka koostumus oli seuraava:

	<u>Aineosa</u>	<u>Määrä (%)</u>
10	Kalajauhe	0,92
	Maissijauho	1,57
	Maissigluteeni	0,92
	CaCO ₃	0,21
	NaCl	0,10
15	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,04
	Juurikasmelassi	2,10
	Soijapapuöljy (raakaa)	3,15
	Lesitiini	0,09
	Vesi	90,90

20 pH säädettiin arvoon 7,2 50-%:sella NaOH-liuoksella.

Istutetun tuotantoelatusaineen annettiin käydä 68 litran altaassa noin 5 päivää 28°C:n lämpötilassa.

25 Käymiselatusainetta ilmastettiin steriilillä ilmalla liuenneen hapen määrän pitämiseksi välillä noin 30-50 % ja sitä sekoitettiin tavallisin sekoittimin nopeudella noin 300 kierr./min.

Esimerkki 2

Tylaktonin eristäminen

30 Esimerkissä 1 selostetulla tavalla saatu käymisliemi (1600 l), suodatettiin suodatusapuainetta käyttäen (3 % Hyflo Supercel, piimaata, Johns Manville Corp.). Suodoksen pH säädettiin arvoon noin 9 lisäämällä 2-pro-

senttista natriumhydroksidia. Suodos uutettiin amyylia-
 asetaatilla (400 l). Amyyliasetaatte-uute (jolla on
 suuri optinen tiheyslukema kohdalla 282 nm, mutta jolla
 ei ole lainkaan mikrobien vastaista vaikutusta) konsent-
 5 roitiin vakuuissa, jolloin saatiin öljyä. Öljy liuotet-
 tiin benseeniin (5 l). Benseeniliuos kromatografioi-
 tiin silikageelikolonnissa (5,25 x 36 tuumaa) (Grace,
 grade 62, Davison Chemical Co), joka oli pakattu ben-
 seenillä. Eluointia seurattiin silikageeli-ohutkerros-
 10 kromatografiaa käyttäen, käyttämällä liuotinsysteemiä
 benseeni: etyyliasetaatte (3:2) ja osoittamiseen väke-
 vääörikkihappo-suihketta. Kolonni eluoitiin ensin
 benseenillä lipoidiainesten poistamiseksi, sitten
 benseeni: etyyliasetaatte-seoksella (9:1) tylaktonin
 15 eroittamiseksi ja eristämiseksi. Tylaktonia sisältävät
 fraktiot yhdistettiin ja haihdutettiin kuiviin vakuu-
 missa. Tylaktoni kiteytettiin benseeni-heksaani-seokses-
 ta tai kuumasta heksaanista, jolloin saatiin noin 2 g
 tuotetta, sp. 162-163°C.

20 Tylaktoni on valkeata kiinteätä ainetta, joka
 kiteytyy heksaanista tai etyyliasetaatte-heksaani-seok-
 sesta ja joka sulaa noin 162-163°C:ssa. Sen prosenttuaa-
 linen alkuainekokoisuus on suunnilleen seuraava:
 hiili, 70 %; vety, 9,7 %; happi, 20,3 %. Sen empiiri-
 25 nen kaava on $C_{23}H_{38}O_5$ ja molekyylipaino noin 394.

Tylaktonin infrapuna-adsorptiospektri klorofoor-
 missa on esitetty oheisessa piirroksessa. Havaittavia
 adsorptio-maksimeja ilmenee seuraavilla taajuuksilla
 (cm^{-1}): 3534 (keskivahva), 2924 (vahva), 2398 (heikko),
 30 2353 (heikko), 1709 (hyvin vahva), 1678 (hyvin vahva),
 1626 (kapea), 1592 (hyvin vahva), 1458 (vahva), 1441
 (olka), 1404 (vahva), 1379 (kapea), 1316 (vahva), 1284
 (keskivahva), 1181 (hyvin vahva), 1143 (vahva), 1103
 (keskivahva), 1078 (keskivahva), 1049 (hyvin kapea),
 35 1025 (keskivahva), 984 (hyvin vahva), 958 (vahva),

923 (keskivahva), 911 (olka), 859 (kapea), 868 (keskivahva), 840 (keskivahva), 820 (hyvin kapea) ja 661 (kapea).

5 Tylaktonin ultraviolettia-absorptio (UV)-spekt-
rissä neutraalissa etanolissa näkyy absorptiomaksimi
kohdalla noin 282 nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 560$).

Tylaktonin ominaiskierto on seuraava:

$$[\alpha]_D^{25} -55,23^\circ \text{ (c 1, CH}_3\text{OH)}.$$

10 Tylaktonin elektrometrinen titraus 66-%:ssä
dimetyyliformamidin vesiliuoksessa osoittaa, että
siinä ei ole titrattavia ryhmiä.

15 Tylaktoni on lähes liukenematon veteen, mutta
liukenee orgaanisiin liuottimiin kuten asetoniin, meta-
noliin, etanoliin, dimetyyliformamidiin, kloroformiin,
dietyylieetteriin, petrolieetteriin, benseeniin ja dime-
tyylisulfoksidiin.

20 Tylaktoni voidaan erottaa tylosiinista silika-
geeli-ohutkerros-kromatografiaa käyttäen. Osoittamiseen
voidaan käyttää rikkihappo-suihketta, joko väkevänä
tai laimennettuna (50 %). Tätä osoitussysteemiä käytettä-
essä tylaktoni näkyy aluksi keltaisena - ruskeana täp-
lämä. Jos kromatografioinnissa käytetään silikageeli-
levyjä, joissa on fluoresoiva tausta. UV-osoittaminen
25 on tarkoituksenmukainen. Tylaktonin likimääräiset Rf-
arvot on koottu taulukkoon 1.

Taulukko 1

Tylaktonin^a ohutkerros-kromatograafinen toteaminen

30	Yhdiste	Rf-arvo	
		A ^b	B
	Tylaktoni	0,50	0,62
	Tylosiini	0,0	0,0

^aVäliaine: silikageeli

35 ^bLiuotin: A = benseeni:etyyliasetatti (4:1)
B = benseeni: etyyliasetatti (3:2).

Esimerkki 33,5-di-0-asetyylytylaktoni

Tylaktonia (200 mg), jota oli valmistettu
 esimerkissä 2 selostetulla tavalla, liuotettiin pyri-
 5 diiniin (4 ml). Lisättiin etikkahappoanhydridiä (4 ml).
 Saadun seoksen annettiin olla paikoillaan huoneen läm-
 pötilassa 16 tuntia ja sen jälkeen se haihdutettiin
 kuiviin vakuuissa. Jäännökseenlisättiin metanolia
 (5 ml); liuosta lämmitettiin 1/2 tuntia 60^o:ssa ja sen
 10 jälkeen se haihdutettiin kuiviin vakuuissa, jolloin
 saatiin 3,5-di-0-asetyylytylaktonia. Tämän yhdisteen R_f-
 arvo on noin 0,59 silikageelillä ohutkerros-kromatograa-
 fisesti määritettynä benseeni:etyyliasetatti (4:1) liuo-
 tinsysteemiä käyttäen. Tylaktonin R_f on tässä liuotin-
 15 systeemissä noin 0,3.

Esimerkit 4-7

3,5-di-0-propionylytylaktonia valmistettiin esi-
 merkin 3 menettelytavan mukaisesti, käyttämällä kui-
 tenkin propionihappoanhydridiä.

20 3,5-di-0-isovalerylytylaktonia valmistettiin
 esimerkin 3 menettelytavan mukaisesti, käyttämällä
 kuitenkin isovaleriaanahappoanhydridiä.

3,5-di-0-bensoylytylaktonia valmistettiin esimer-
 kin 3 menettelytavan mukaisesti, käyttämällä kuitenkin
 25 bensoehappoanhydridiä.

3,5-di-0-(n-butyryyli)tylaktonia valmistettiin
 esimerkin 3 menettelytavan mukaisesti, käyttämällä
 kuitenkin n-voihappoanhydridiä.

Esimerkki 830 Tyloosin valmistaminen tylaktonista

Streptomyces fradiae-lajia, joka oli ennen tuot-
 tanut tyloosiinia, mutta joka oli blokeerattuna makro-
 lidirenkaan sulkeutuessa, käytettiin esimerkissä 1,
 osassa A selostetun menetelmän mukaisesti. käytetyn
 35 lämpötilan ollessa kuitenkin 28^oC. Käymisliemeen lisät-

tiin 48 tunnin kuluttua istutuksesta tylakotnia. Käymisen annettiin sitten jatkua kunnes tylosiinia oli muodostunut riittävästi, so. vielä noin kolmen päivän ajan. Tylosiinin läsnäolo määritettiin koestamalla

5 elatuslieminäytteitä organismeja vastaan, joiden on tiedetty olevan herkkiä tylosiinille. Eräs käyttökelpoinen koeorganismi on *Staphylococcus aureus* ATCC 9144. Biomääritys on mukava suorittaa automaattisella sameusmittausmenetelmällä, ohutkerros-kromatografiaa tai suu-

10 ritehoista nestekromatografiaa käyttäen ja käyttämällä toteamiseen UV-säteilytystä.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä tylaktonin, tai sen esterijohdan-
naisen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että
5 menetelmässä viljellään *Streptomyces fradiae* NRRI 12188,
tai sen tylaktonia tuottavaa mutanttia tai rekombinaa-
tiota, elatusaineessa, joka sisältää assimiloitumis-
kykyisiä lähtöaineita, joissa on hiiltä, typpeä ja epä-
orgaanisia suoloja, pinnanalaisissa aerobisissa käymis-
10 olosuhteissa tylaktonin tuottamiseksi, mikä jälkeen
seuraa, valinnaisesti, esteröinti.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että siinä viljellään *Strepto-*
myces fradiae NRRL 12188.

15 3. *Streptomyces fradiae* NRRL 12188.

4. Elatusaine, t u n n e t t u siitä, että se
sisältää *Streptomyces fradiae* NRRL 12188 ja assimi-
loitumiskykyisiä lähtöaineita, joissa on hiiltä, typpeä
ja epäorgaanisia suoloja.

Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av tylakton,
eller ett esterderivat därav, k ä n n e t e c k n a t
5 därav, att man odlar *Streptomyces fradiae* NRRL 12188,
eller en tylaktonproducerande mutant eller rekombina-
tion därav, i ett kulturmedium som innehåller assimiler-
bara källor av kol, kväve och oorganiska salt under
indränkta aerobiska jäsningsförhållanden för produ-
10 cerande av tylakton, varefter eventuellt föresteras.
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att man odlar *Streptomyces*
fradiae NRRL 12188.
4. Kulturmedium, k ä n n e t e c k n a t därav,
15 att det omfattar *Streptomyces fradiae* NRRL 12188 och
assimilerbara källor av kol, kväve och oorganiska salt.

